

Univerzita Karlova
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biologie
Studijní obor: Mikrobiologie



Bc. Klára Hryzáková

Mechanismus působení bakteriocinů odvozených z fágů na cílové buňky a na umělé
membránové systémy

The mechanism of action of phage tale-like bacteriocins on target cells and artificial
membrane systems

Diplomová práce

Školitel: RNDr. Radovan Fišer, Ph.D.

Praha, 2017

Charles University

Faculty of Science

Study programme: Biology

Study branch: Microbiology



Bc. Klára Hryzáková

The mechanism of action of phage tail-like bacteriocins on target cells and artificial
membrane systems

Mechanismus působení bakteriocinů odvozených z fágů na cílové buňky a na umělé
membránové systémy

Diploma thesis

Supervisor: RNDr. Radovan Fišer, Ph.D.

Prague, 2017

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 30.07.2017

.....
Klára Hryzáková

Poděkování

Ráda bych poděkovala svému školiteli RNDr. Radovanu Fišerovi, Ph.D. za vedení této diplomové práce a za cenné rady a nápady, které mi poskytoval během celého studia.

Dále bych také chtěla poděkovat RNDr. Gabriele Seydlové, Ph.D. a Mgr. Tereze Dolejšové za pomoc a rady při mé experimentální činnosti.

Nakonec mé díky patří také doc. Ivo Konopáskovi, Csc. a všem dalším členům Laboratoře Fyziologie bakterií za podporu, pomoc a vytváření přátelského pracovního prostředí.

Diplomová práce vznikla za finanční podpory Grantové agentury České republiky v rámci projektu GA15-01687S.

Abstrakt

Fonticiny jsou bakteriociny produkované gram-negativní bakterií *Pragia fontium* z čeledi *Enterobacteriaceae*. Patří mezi bakteriociny odvozené z fágů, které můžeme rozdělit do dvou skupin na: flexibilní (typ F) a kontraktilní částice (typ R). *Pragia fontium* produkuje částice typu R, které se váží na povrch citlivých buněk a tvoří póry v membráně pravděpodobně během kontrakce, mechanismem podobným sekrečnímu systému typu VI. Pórotvornou aktivitu jsme testovali na živých bakteriálních buňkách i *in vitro* na umělých membránových systémech. Na černých lipidových membránách tvoří fonticiny v membránách velké póry, jejichž vodivost (G) je přibližně dvakrát větší než vodivost známějšího α -hemolysinu, produkovaného bakterií *Staphylococcus aureus*. Dále jsme testovali napětově závislé blokace fonticinového nanopóru způsobené proteiny v nativním i rozvolněném stavu, různými typy DNA, polyethylenglykolem a diamantovými nanočásticemi. Rigidní struktura fonticinové nanotrubičky, v kombinaci s konstantní vodivostí, činí z fonticinů slibné nanozařízení vhodné pro analýzu tvaru a velikosti nanočástic a velkých makromolekul.

Klíčová slova: fonticin, bakteriocin, nanopór, *Pragia fontium*, blokace, pórotvorná aktivita, černé lipidové membrány.

Abstract

Fonticins are phage tail-like bacteriocins produced by gram-negative bacterium *Pragia fontium* from the family *Enterobacteriaceae*. Phage tail-like bacteriocins can be divided into two different families: flexible ones (F-type) and contractile particles (R-type). *Pragia fontium* produces R-type particles that adsorb on the surface of sensitive bacterial cell and form pores probably during the contraction using mechanism similar to Type VI Secretion System. The pore-forming activity of fonticins was tested *in vivo* using bacterial cells. It was also characterized *in vitro* on artificial lipid membranes. On Black Lipid Membranes fonticins create large channels into the membranes; single channel conductance (G) is about two times higher than single channel conductance of well known α -hemolysine produced by *Staphylococcus aureus*. Further, we tested the voltage-dependent blocking of fonticin pores by native and unfolded proteins, dsDNA, ssDNA, polyethylene glycol and diamond nanoparticles. The rigid structure of fonticin nanotube in combination with constant conductivity makes it a promising device for analysing the size and shape of nanoparticles and large macromolecules.

Key words: fonticin, bacteriocine, nanopore, *Pragia fontium*, blocking, pore-forming activity, black lipid membranes.

Obsah

ABSTRAKT	3
ABSTRACT	4
SEZNAM ZKRATEK.....	7
1 ÚVOD.....	8
2 CÍLE PRÁCE	9
3 LITERÁRNÍ PŘEHLED.....	10
3.1 BAKTERIOCINY	10
3.1.1 Bakteriociny odvozené z fágů	10
3.1.2 Receptorová specifita bakteriocinů odvozených od fágů	13
3.1.3 Fonticiny.....	15
3.1.4 <i>Pragia fontium</i>	15
3.2 KONTRAKTILNÍ INJEKČNÍ SYSTÉMY	16
3.2.1 Sekreční systém typu VI.....	17
3.3 ANALÝZA MOLEKUL POMOCÍ NANOPÓRU	18
3.3.1 Hmotnostní spektrometrie v roztoku	19
3.3.2 Detekce a charakterizace proteinů.....	22
3.3.3 Nanopórové sekvenování.....	23
4 MATERIÁL A METODY	26
4.1 BAKTERIÁLNÍ KMENY	26
4.2 KULTIVAČNÍ MEDIA	26
4.3 KULTIVACE BAKTERIÁLNÍCH KULTUR.....	27
4.4 PRODUKCE FONTICINŮ.....	27
4.5 INHIBIČNÍ ZÓNY	28
4.6 ČERNÉ LIPIDICKÉ MEMBRÁNY	28
4.6.1 Analýza jednotlivých vodivostních událostí	30
4.7 SLEDOVÁNÍ PERMEABILIZACE MEMBRÁNY POMOCÍ VSTUPU FLUORESCENČNÍ SONDY DO BUŇKY	31
4.8 IZOLACE BAKTERIÁLNÍCH LIPIDŮ	32
4.9 IZOLACE PLAZMIDOVÉ DNA	33
4.10 SRÁŽENÍ DNA ETANOLEM.....	34
4.11 RESTRIKČNÍ ŠTĚPENÍ PLAZMIDOVÉ CDNA	35
4.12 PURIFIKACE DNA	35
4.13 GELOVÁ ELEKTROFORÉZA	36

4.14	TRANSMISNÍ ELEKTRONOVÁ MIKROSKOPIE – NEGATIVNÍ BARVENÍ	36
5	VÝSLEDKY	38
5.1	INDUKCE PRODUKCE FONTICINŮ	38
5.2	VLIV KONCENTRACE FONTICINŮ NA SCHOPNOST INHIBOVAT RŮST CITLIVÝCH BUNĚK	40
5.2.1	<i>Detekce hynutí citlivých buněk (Propidium iodide assay)</i>	<i>41</i>
5.3	STRUKTURA FONTICINŮ	44
5.3.1	<i>Produkce fonticinů indukovaná UV zářením</i>	<i>48</i>
5.4	ČERNÉ LIPIDICKÉ MEMBRÁNY	49
5.4.1	<i>Experimentální podmínky pro měření s fonticiny na BLM</i>	<i>49</i>
5.4.2	<i>Závislost vodivosti fonticinů na koncentraci elektrolytu</i>	<i>50</i>
5.4.3	<i>Rozměry fonticinového póru</i>	<i>52</i>
5.4.4	<i>Charakterizace a analýza molekul procházejících nanopórem</i>	<i>54</i>
5.4.5	<i>Blokace α-hemolysinu</i>	<i>54</i>
5.4.6	<i>Blokace fonticinových kanálů DNA</i>	<i>56</i>
5.4.7	<i>Blokace fonticinových kanálů nanodiamanty</i>	<i>59</i>
5.4.8	<i>Blokace fonticinových kanálů BSA</i>	<i>60</i>
5.4.9	<i>Blokace fonticinových kanálů polyethylenglykolem 8000</i>	<i>61</i>
6	DISKUZE	63
7	SOUHRN	70
8	SEZNAM LITERATURY	71

Seznam zkratek

A.U.	bezrozměrná jednotka, v této práci značí intenzitu fluorescence (<i>arbitrary unit</i>)
BLM	černé lipidické membrány (<i>Black Lipid Membranes</i>)
bp	počet párů bazí (<i>base pair</i>)
BSA	hovězí sérový albumin (<i>Bovine Serum Albumin</i>)
DNP	diamantové nanočástice (<i>diamond nanoparticles</i>)
dsDNA	dvouvláknová DNA
EF	Edémový faktor
HEPES	kyselina N-2-hydroxyethylpiperazin-N'-2-ethansulfonová
LamB	maltózový pór vnější membrány
LB médium	Luria-Bertani médium
LF	Letální faktor
LPS	lipopolysacharid
MspA	proteinový pór (<i>Mycobacterium smegmatis</i> porin A)
M _w	molární hmotnost (<i>Molecular weight</i>)
OD	optická denzita
OmpC	proteinový pór vnější membrány
OmpF	proteinový pór vnější membrány
PA	Protektivní antigen
PEG	polyethylenglykol
PI	Propidium jodid
PVC	Virulenční kazeta produkovaná bakterií <i>Photorhabdus</i>
Rpm	počet otáček za minutu (<i>rounds per minute</i>)
SM pufr	100mM NaCl, 8mM MgSO ₄ ·7H ₂ O, 50mM Tris-HCl, 0,01% (w/v) želatina
ssDNA	jednovláknová DNA
T6SS	sekreční systém typu VI
Tris	tris(hydroxymethyl)aminomethan
Trx	Thioredoxin
v/v	poměr objemů dvou látek v roztoku
w/v	hmotnostní koncentrace látky v rozpouštědle

1 Úvod

Bakteriální buňky si vyvinuly mnoho různých prostředků, díky kterým jsou schopny soutěžit o své ekologické niky a zdroje živin. Tyto prostředky jsou běžně produkty sekundárních metabolismů nebo polypeptidové syntézy. Zatímco antibiotika, jakožto produkty sekundárního metabolismu, většinou cílí na široké spektrum bakterií, polypeptidové komplexy jsou schopny inhibovat růst nebo zabít citlivé buňky zejména blízké příbuzných bakteriálních druhů.

Baktericidní účinek proti blízké příbuzným bakteriálním druhům byl objeven u bakteriocinů odvozených od krčků fágů. Mezi tyto bakteriociny patří i takzvané fonticiny. Jedná se o relativně nově objevené částice, které zatím nebyly příliš prozkoumány (Šmarda a Benada 2005). Fonticinové částice jsou produkovány gram-negativní bakterií *Pragia fontium* z čeledi *Enterobacteriaceae*. Bakteriociny podobné krčkům fágů, jsou velké proteinové komplexy, které se svojí morfologií podobají sekrečnímu systému typu VI. Tímto sekrečním systémem jsou obvykle dopravovány velké makromolekuly z bakteriálních buněk ven do extracelulárního prostředí u mnoha druhů gram-negativních bakterií. Mechanismus působení bakteriocinů odvozených z fágů, tedy i fonticinů, je pravděpodobně opačný. Komplexy se váží na receptory citlivých buněk a vytvářejí velké transmembránové kanály, kterými dochází k úniku iontů a makromolekul z buněk do prostředí. Následkem toho dochází k depolarizaci membrány a buněčné smrti. Na rozdíl od antibiotik působí bakteriociny odvozené z fágů velmi specificky na blízké příbuzné bakteriální kmeny.

Pórotvorné toxiny mají kromě své úlohy v patofyziologii také nezastupitelnou roli v základním výzkumu jako zařízení pro charakterizaci širokého spektra molekul a nanočástic. Například α -hemolysin produkováný bakterií *Staphylococcus aureus* se používá jako nanozařízení k sekvenování DNA (Bayley 2006) nebo k hmotnostní spektrometrii v roztoku (Robertson *et al.* 2007). Obě metody jsou založeny na rozdílných vodivostních stavech způsobených analyty různých velikostí, které jsou schopny blokovat nanopór, když jím procházejí. Naším cílem bylo ověřit, že fonticiny jsou dostatečně velký proteinový komplex, který bude tvořit dost velké póry na to, aby bylo možné charakterizovat i větší molekuly a nanočástice.

2 Cíle práce

Cílem této diplomové práce bylo charakterizovat vlastnosti fonticinů, bakteriocinů odvozených od krčků fágů, na živých buňkách i na umělých membránových systémech.

Jednotlivé cíle jsou shrnuty v následujících bodech:

- Ověření účinku fonticinů *in vivo* vytvářením inhibičních zón na citlivých buňkách a pomocí fluorescenčních pokusů s propidium jodidem.
- Charakterizace pórtvorných vlastností fonticinů na černých lipidických membránách, za účelem využití fonticinových kanálů jako nanozařízení.
- Porovnání pórtvorných vlastností fonticinů s kontrolními molekulami, především s dobře prozkoumaným α -hemolysinem, produkovaným bakterií *Staphylococcus aureus*. Dále porovnání fonticinů s literaturou, zejména s pyocinem typu R, produkovaným bakterií *Pseudomonas aeruginosa*.
- Detekce a charakterizace různých druhů molekul a nanočástic pomocí fonticinů.

3 Literární přehled

3.1 Bakteriociny

Mikroorganismy produkují široké spektrum nástrojů na svoji ochranu. Mezi tyto nástroje patří antibiotika, dále produkty primárního metabolismu, bakteriolytické enzymy a různé typy bakteriocinů (Tagg *et al.* 1976). Bakteriociny jsou velmi heterogenní skupina částic, které se od sebe liší morfologickými i biochemickými vlastnostmi (Daw a Falkner 1996). Bakteriociny sahají od jednoduchých látek proteinové povahy až po složité komplexy s velkou molekulovou hmotností, které inhibují nebo zabíjejí blízké příbuzné bakteriální druhy (Tagg *et al.* 1976). Produkce bakteriocinů byla zaznamenána téměř u většiny bakteriálních kmenů, dokonce i u některých kmenů *Archea* (Torreblanca *et al.* 1989).

U gram-negativních bakterií jsou rozeznávány specifické receptory, které zprostředkovávají vazbu bakteriocinu na bakteriální membránu. K zabíjení nebo inhibici růstu buňky dochází různými mechanismy, například inhibicí růstu buněčné stěny, vytvářením pórů v cytoplasmatické membráně, nespecifickou degradací hostitelské genetické informace, nebo inhibicí proteinové syntézy štěpením 16S rRNA (Riley 1998). U gram-pozitivních bakterií nebývá přítomnost specifického receptoru nutná, protože jejich buněčná stěna umožňuje průchod i relativně velkým molekulám (Jack *et al.* 1995).

Bakteriociny se od antibiotik liší zejména úzkou hostitelskou specifitou a také tím, že jsou jen docela málo toxické pro savčí buňky. Díky těmto vlastnostem se zvýšil zájem o bakteriociny jako prostředku ke konzervování jídla. V popředí zájmu pak jsou hlavně bakteriociny produkované bakteriemi mléčného kvašení, zejména nisin (Cleveland *et al.* 2001; Cotter *et al.* 2013).

3.1.1 Bakteriociny odvozené z fágů

Speciální skupinou bakteriocinů jsou částice s velkou molekulovou hmotností, které mají společný evoluční původ s krčky bakteriofágů. Produkce bakteriocinů odvozených z fágů byla objevena u mnoha druhů gram-negativních bakterií (Strauch *et al.* 2001). Mezi nejčastěji studované patří například pyociny produkované bakterií *Pseudomonas aeruginosa* (Michel-Briand a Baysse 2002), enterokolitociny produkované *Yersinia enterocolitica* (Strauch *et al.* 2003), carotovoricin Er produkovaný rostlinným patogenem *Erwinia carotovora* (Nguyen *et al.* 2001) nebo xenorhabdycin produkovaný *Xenorhabdus nematophila* (Thaler *et al.* 1995). Produkce bakteriocinů odvozených z fágů byla zaznamenána také u gram-pozitivních bakterií, například u patogenní bakterie *Clostridium difficile* (Gebhart

et al. 2012). V literatuře se rovněž můžeme setkat s pojmenováním tailociny, které obecně označuje částice podobné fágům, které postrádají geny pro fágovou hlavičku (Gill a Young 2011).

Na rozdíl od bakteriofágů postrádají tyto bakteriociny kromě hlavičky také DNA, takže nejsou schopny infekce. Bakteriociny odvozené z fágů můžeme rozdělit do dvou morfologických skupin. Jedná se o skupiny kontraktilních částic typu R a nekontraktilních, zato ohebných částic typu F (Michel-Briand a Baysse 2002).

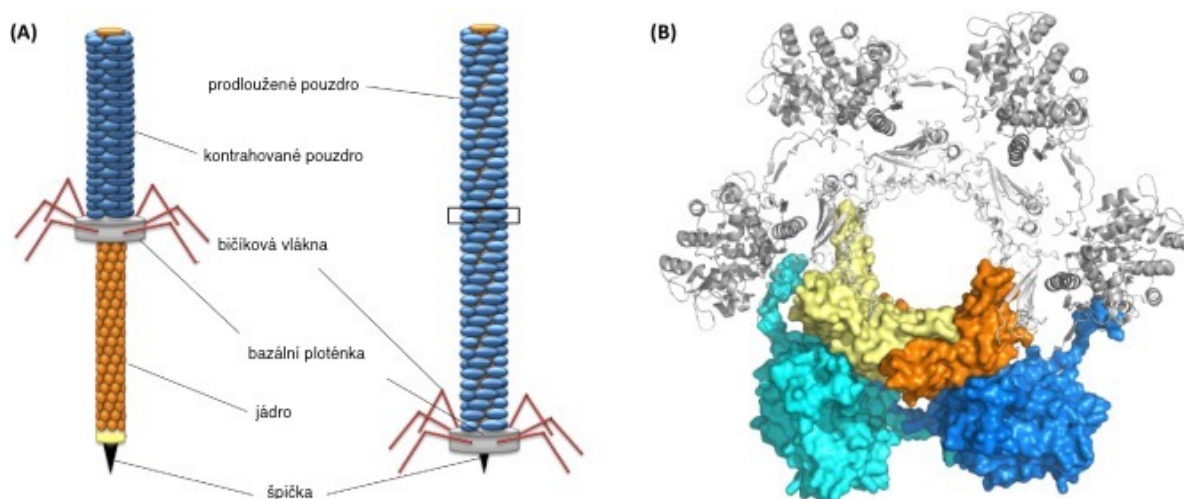
Nejvíce studované bakteriociny odvozené od fágů jsou pyociny, produkované rodem *Pseudomonas* (Kageyama 1964). Na tomto modelovém proteinovém komplexu budou popsány charakteristické rysy společné pro většinu tailocinů. Kontraktilní typ pyocinu je v nativní formě tvořen prodlouženým pouzdem, složeným ze 34 proteinových prstenců. V kontrahované podobě je tvořen kontrahovaným pouzdem zakončeným bazální ploténkou s bičíkovými vlákny, která ústí v jádro pyocinu. Jádro je zakončeno špičkou, kterou dochází k narušení membrány (Obr. 1) (Michel-Briand a Baysse 2002).

Pyocin typu F je ohebná nekontraktilní tyčinková struktura složená z 23 prstenců a distální oblasti, ze které vycházejí dlouhá a krátká bičíková vlákna (Michel-Briand a Baysse 2002). Kontraktilní pyociny typu R zabíjejí citlivé bakteriální buňky tak, že se váží na receptory na povrchu buněk, po vazbě na receptor dochází ke konformačním změnám; kontraktilní pouzdro se stáhne a jádro s ostrou špičkou prochází buněčnou membránou. Celý tento proces vede k depolarizaci cytoplasmatické membrány a k lýzi buňky (Uratani a Hoshino 1984). Za specifickou vazbu na receptor citlivé buňky jsou zodpovědná bičíková vlákna, která se váží na různé lipopolysacharidy v závislosti na typu bakteriocinu. (Kohler *et al.* 2010). Pyociny typu R zabíjejí citlivé buňky velmi účinně; jediná molekula pyocinu je schopná zabít bakteriální buňku. Pyociny typu F jsou účinné o něco méně, na zabití jedné buňky je potřeba 200 až 300 molekul (Kageyama 1964; Kageyama *et al.* 1964; Kuroda a Kageyama 1981). Přes to, že by měla být jediná molekula kontraktilní částice schopná vytvořit dostatečně velký transmembránový pór na to, aby došlo k depolarizaci cytoplasmatické membrány, obvykle dochází k vazbě mnoha tisíc molekul na receptory citlivých buněk (Obr. 2) (Strauch *et al.* 2001).

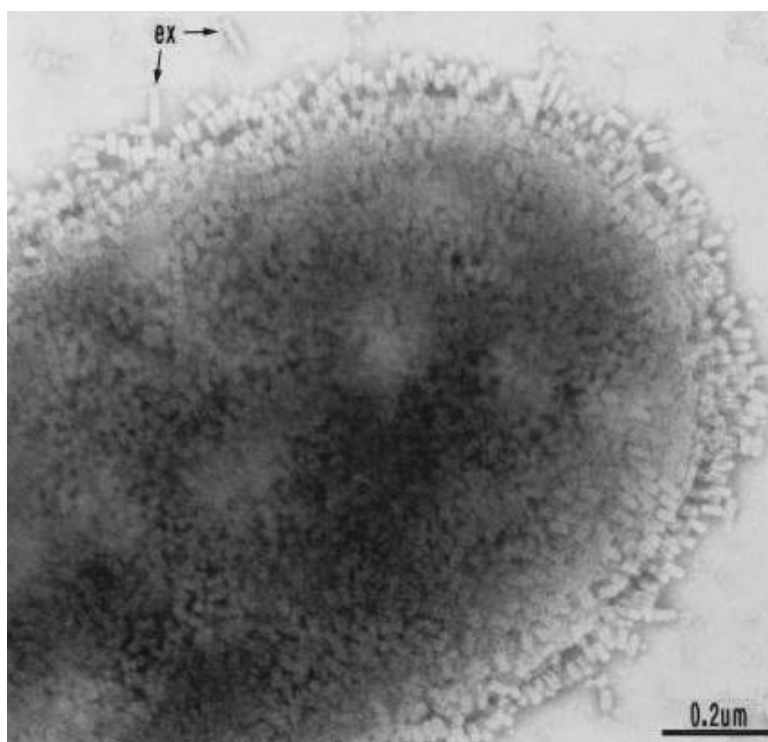
Vzhledem k tomu, že se do produkce tailocinů zapojuje jen část populace bakteriálních buněk produkčního kmene, tak je průměrná spontánní produkce bakteriocinů odvozených z fágů velmi nízká. Produkce se dá zvýšit použitím mutagenního činidla; až o dva řády lze indukovat produkci pomocí UV záření nebo přidáním mitomycinu C

(1-2 $\mu\text{g/ml}$) k rostoucí kultuře. Mechanismus, jakým k indukci dochází, však není zcela znám (Strauch *et al.* 2001; Šmarda a Benada 2005).

Strukturní podobnost mezi některými bakteriociny a fágy byla pozorována pomocí elektronové mikroskopie. Mezi pyociny a fágy existuje také sekvenční homologie, díky čemuž se zjistilo, že typ R pyocinu má společného předka s fágem P2, zatímco typ F je nejpodobnější fágu lambda *Escherichia coli* (Nakayama *et al.* 2000). Dřívější práce předpokládaly, že R-typ i F-typ pyocinu vznikly jako defekt fágů (Kageyama *et al.* 1979). Nyní se však o těchto částicích uvažuje spíše jako o krčcích fágů, které se evolučně specializovaly jako bakteriociny. Zejména proto, že u nich nebyly nalezeny geny pro vytváření fágové hlavičky, ani geny pro replikaci a integraci (Nakayama *et al.* 2000).



Obr. 1: Struktura bakteriocinu odvozeného z krčku fágů. A. Bakteriocin v kontrahované (vlevo) a v nativní podobě (vpravo). Oranžové podjednotky ukazují jádro bakteriocinu (rigidní trubička), modře jsou označeny podjednotky tvořící kontrahovatelné pouzdro. Z bazální ploténky (šedá) vycházejí bičíková vlákna, která jsou zodpovědná za vazbu na lipopolysacharidy. Na konci jádra je špička, kterou bakteriocin narušuje membránu. B. Struktura R2 pyocinu v jeho nekontrahované podobě při pohledu shora. Modře a tyrkysově jsou vyznačeny dva protomery pouzdra, oranžová a žlutá značí protomery jádra (Ghequire a De Mot 2015).



Obr. 2: Bakteriociny odvozené z fágů navázané na receptory citlivé buňky. Vazba kontraktilních enterokoliticinů (produkovaných bakterií *Y. enterocolitica*) na receptory vnější membrány citlivého kmene *Y. enterocolitica* 13169. Ex označuje *extended particles*, nekontrahované částice, které se na receptor nenavázaly.

3.1.2 Receptorová specifita bakteriocinů odvozených od fágů

Receptory pro vazbu kontraktilních pyocinů na buněčnou stěnu bakterií jsou převážně lipopolysacharidy (Govan 1974). Ukázalo se, že specifickou složkou receptoru je pravděpodobně *core* polysacharidu (Meadow a Wells 1978). Pyociny se váží na lipopolysacharidový receptor pomocí bičíkových vláken. Produkční kmeny pyocinů typu R jsou rezistentní vždy alespoň ke svým vlastním pyocinům, díky tomu, že postrádají specifický receptor (Kohler *et al.* 2010).

Specifita vazby bičíkových vláken na receptor byla testována vytvořením modifikovaného chimerického pyocinu R, kterému byla nahrazena bičíková vlákna za vlákna bakteriofága PS17. Pyocin R2 je tomuto fágu poměrně příbuzný, shodují se v 53 % aminokyselin v sekvenci. Takto upravený pyocin měl odlišné baktericidní spektrum než ostatní pyociny, které se vyskytují přirozeně (Williams *et al.* 2008).

Lipopolysacharidy jako receptory byly nalezeny i u jiných bakteriocinů odvozených z fágů. Například enterokoliticiny produkované bakterií *Y. enterocolitica* se váží na vnější část lipopolysacharidového *core* (Strauch *et al.* 2003). Stejně tak je tomu i u proteocinů produkovaných bakterií *Proteus vulgaris* (Coetzee *et al.* 1968).

Receptory bakteriofágů jsou často také složeny z lipopolysacharidů, například receptorem T4 bakteriofágů, který je kontraktilem injekčním systémem příbuzný, jsou lipopolysacharidy společně s OmpC, proteinovým pórem vnější membrány (Yu a Mizushima 1982). Pro T3 fágy jsou receptorem lipopolysacharidy typu R (Prehm *et al.* 1976). Na receptory bez lipopolysacharidů se zase váže například T2 fág, jehož receptorem je proteinový pór vnější membrány OmpF (Riede *et al.* 1985). Dalším takovým je λ fág *E. coli*, který se váže na maltózový pór vnější membrány LamB (Berkane *et al.* 2006).

3.1.2.1 Bakteriofágová terapie

Již několik desítek let se postupně zvyšuje rezistence bakteriálních kmenů k antibiotikům. Přesto, že se proti těmto rezistentním bakteriím neustále vyvíjejí nová antibiotika, bakterie si nakonec dokáží vytvořit rezistenci i k novým látkám (Fair a Tor 2014). Bakteriofágová terapie využívá fágy nebo fágům příbuzná terapeutika, jako jsou bakteriofágové lysiny nebo bakteriofágy odvozené z fágů, k léčbě bakteriálních infekčních chorob (Matsuzaki *et al.* 2005). Díky svým vlastnostem jsou bakteriofágy ideální jako nástroj proti patogenním bakteriím; často jsou vysoce hostitelsky specifické, jsou netoxické pro eukaryotní buňky a velmi snadno se množí (Summers 2001).

V současné době se testují antibakteriální vlastnosti bakteriocinů odvozených z fágů na živých modelech. Na základě pozitivních výsledků *in vitro* studovali Damasko *et al.* (2005) antimikrobiální účinky enterokolitocinu proti střevnímu patogenu *Yersinia enterocolitica* O3 na živých myších modelech. Patogen a následně i bakteriociny byly podávány myším perorálně. Antibakteriální účinnost bakteriocinu byla zaznamenána u myši pouze do šesti hodin od nakažení. Na rozdíl od *in vitro* pokusů byl úbytek bakteriálních buněk ve střevě nižší než úbytek v rostoucí kultuře, pravděpodobně díky odlišnému fyziologickému stavu bakteriálních buněk, navázaných na myších eukaryotních buňkách v *in vivo* pokusech (Damasko *et al.* 2005).

Ukázalo se, že bakteriociny jsou v některých modelových případech účinné v boji proti bakteriálním infekcím a mají tak do budoucna potenciál jako úzkospektrá terapeutika (Behrens *et al.* 2017).

3.1.3 Fonticiny

Fonticiny jsou částice, jejichž produkci poprvé popsal profesor Šmarda (1987) a jeho výzkumná skupina. Jedná se o kontraktilní, ale i o flexibilní bakteriociny odvozené z fágů, produkované gram-negativní bakterií *Pragia fontium*. Produkce bakteriocinů odvozených z fágů byla zaznamenána u pěti kmenů *Pragia fontium*. Každý kmen byl schopen zabít buňky alespoň některého z ostatních produkčních kmenů, ale žádný z těchto kmenů nebyl citlivý ke svým vlastním fonticinům. Produkce bakteriocinů probíhá u všech produkčních kmenů samovolně, ale přidáním mitomycinu C (1 µg/ml) k rostoucí kultuře lze produkci zvýšit o několik řádů (Šmarda a Benada 2005).

V kultivačním médiu produkčních kmenů se objevuje několik různých struktur (Obr. 3); v naprosté většině jsou to kontraktilní fonticiny v nativní a kontrahované podobě, dále složené útvary z několika podjednotek kontrahovaných částic a ve velmi malé míře také flexibilní fonticiny. Kontraktilní typ fonticinu měří v nativní konformaci 115 nm na délku a 20 nm na šířku. Stejně jako ostatní bakteriociny odvozené od fágů jsou kontraktilní fonticiny složeny z jádra, které je obaleno kontraktilním pouzdrem. Konec pouzdra navazuje na bazální ploténku s bičíkovými vlákny. U těchto bakteriocinů se předpokládá, že jsou schopny tvořit obří transmembránové kanály mechanismem podobným sekrečnímu systému typu VI (Ge *et al.* 2015). Jedná se o tak velké částice, že jediná molekula by mohla být schopná způsobit buněčnou smrt citlivé buňky (Šmarda a Benada 2005).

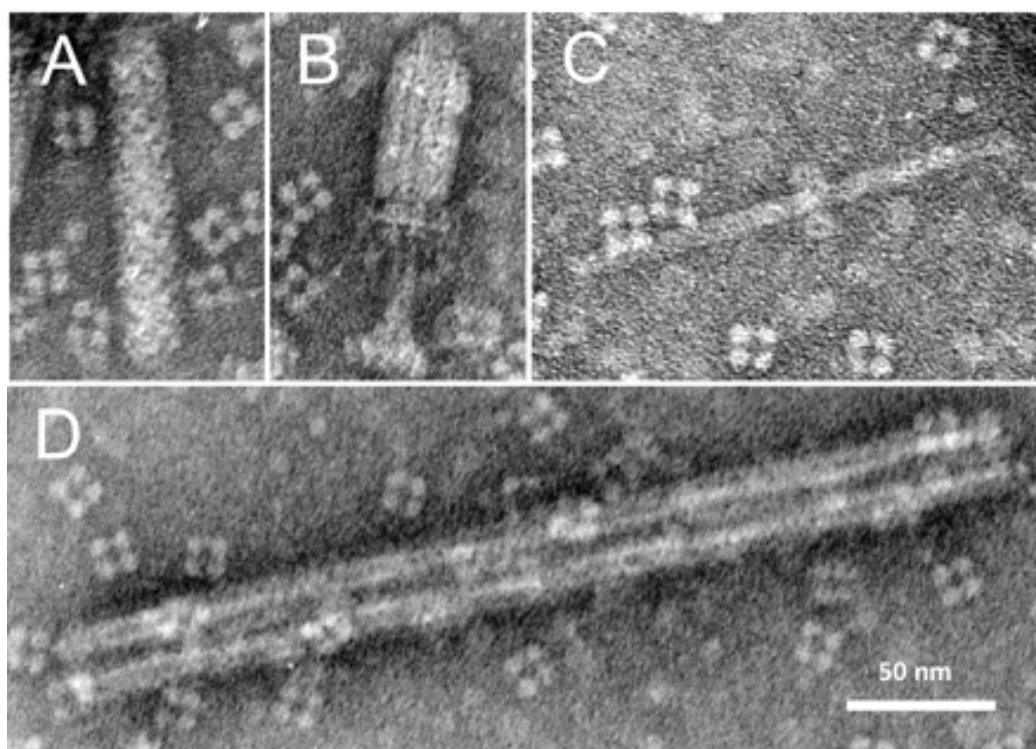
3.1.4 *Pragia fontium*

Pragia fontium je gramnegativní, mesofilní, tyčinkovitá bakterie z čeledi *Enterobacteriaceae*, která byla popsána v roce 1988 (Aldová *et al.*) Rod *Pragia* zahrnuje pouze jediný druh – *Pragia fontium*. Na území bývalého Československa bylo doposud izolováno 18 kmenů, převážně ze studní a vodovodního potrubí.

P. fontium produkuje H₂S a dokáže oxidovat glukonát, díky čemuž můžeme odlišit tento druh od dalších producentů H₂S z čeledi *Enterobacteriaceae*, například *Budvicia* spp. a *Leminorella* spp. Na rozdíl od ostatních příbuzných rodů z této čeledi je *P. fontium* považována za volně žijící bakterii a není spojována s žádným hostitelem (Snopková *et al.* 2017).

V roce 2015 byl osekvenován kompletní genom *P. fontium* 24613. Bylo zjištěno, že tento kmen obsahuje pouze chromozomální DNA, žádná plazmidová DNA nebyla nalezena. DNA je složena z 4 094 kbp, z čehož 45,4 % tvoří G + C páry. Předpokládá se, že genom

obsahuje 3 579 genů, z čehož naprostá většina jsou sekvence kódující proteiny, 146 pseudogenů, 22 genů pro rRNA a 72 genů kódujících tRNA (Snopková *et al.* 2015).

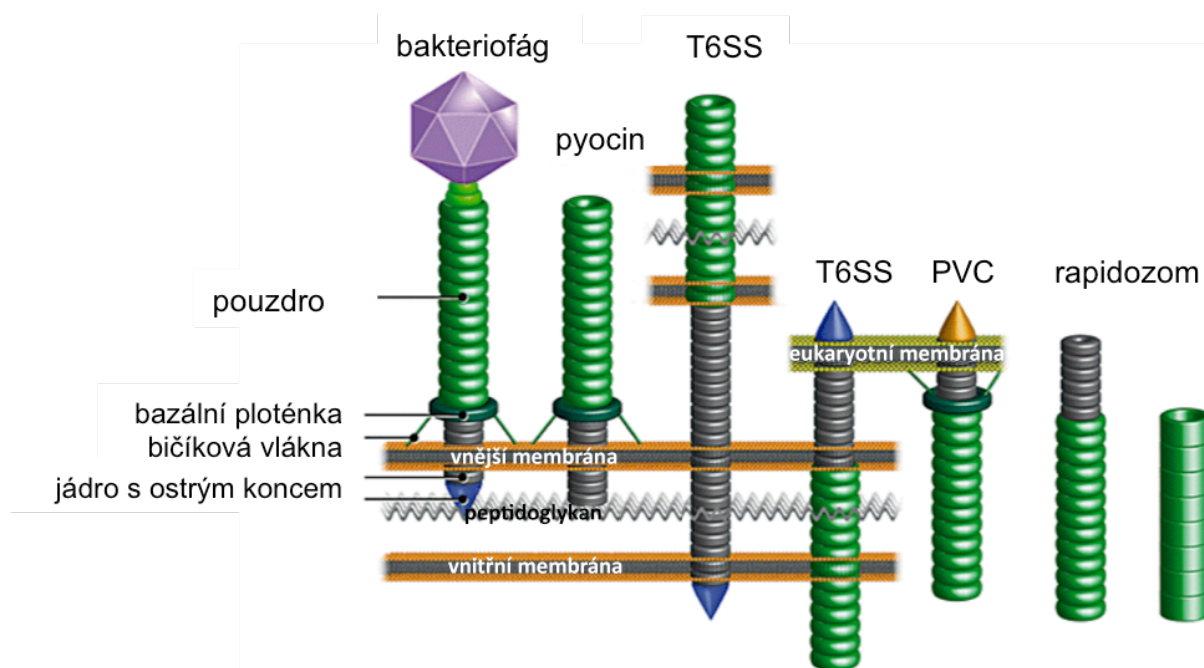


Obr. 3: Na obrázku A z elektronového mikroskopu je základní struktura kontraktilní částice produkované bakterií *Pragia fontium*, na obrázku B je kontrahovaná forma částice. Z obrázku C a D je patrné, že se mohou bakteriociny skládat ze dvou i více jednotek. Na obrázku C je dimer složený z fonticinových jader a na obrázku D je vidět pentamer z kontrahovaných podjednotek (Šmarda a Benada 2005).

3.2 Kontraktilní injekční systémy

Bakteriální patogeneze je z části závislá na schopnosti bakterií produkovat molekuly s antibakteriálním účinkem, a to buď do extracelulárního prostoru nebo přímo do okolních buněk. Bylo objeveno několik makromolekulárních sekrečních systémů, které jsou schopny translokovat tyto molekuly i přes buněčnou stěnu gram-negativních bakterií (Obr. 4) (Bonemann *et al.* 2010). Do skupiny kontraktilních injekčních systémů patří fagy s kontraktilním krčkem z čeledi *Myoviridae*, například bakteriofág T4 (Leiman *et al.* 2003). Shodným mechanismem vytvářejí otvory do bakteriálních membrán i bakteriociny odvozené z fágů (Nakayama *et al.* 2000; Basler 2015). Některé patogenní bakterie využívají sekreční systém typu VI na translokaci virulenčních faktorů do eukaryotních buněk, mezi takové patří například *Vibrio cholerae* (Bingle *et al.* 2008). Sekreční systém typu VI je bakteriemi také využíván jako nástroj mezidruhového boje (Russell *et al.* 2014). Mezi tyto kontraktilní

injekční systémy patří také virulenční kazety hmyzích patogenů (PVC), bakterií *Photorhabdus* a *Serratia entomophila*, které injikují do hmyzu toxiny, zodpovědné za rozpadávání hemocytů (Yang *et al.* 2006). Další příbuzný systém byl objeven u bakterií, které indukují proměnu u mořských živočichů (Shikuma *et al.* 2014). Zvláštním případem jsou takzvané rapidozomy, jejichž funkce není doposud objasněna, ale byla potvrzena jejich příbuznost s pyociny (Yamamoto 1967; Pazirandeh a Campbell 1993).



Obr. 4: Schematické zobrazení kontraktálních injekčních systémů; T4 bakteriofág a jemu příbuzné systémy, které dokáží porušit bakteriální (bakteriofág T4, pyocin, T6SS) nebo eukaryotní (sekreční systém typu VI, PVC) membránu (Bonemann *et al.* 2010).

3.2.1 Sekreční systém typu VI

Sekreční systém typu VI (T6SS) je makromolekulární proteinový sekreční systém u gram-negativních bakterií, který slouží jako nástroj virulence. Bakterie pomocí sekrečního systému translokují proteiny a DNA ven z buňky do prostředí nebo přímo do buněk v okolí (Bingle *et al.* 2008; Leiman *et al.* 2009). Sekreční systém typu VI byl nalezen v genomu 25 % doposud osekvenovaných bakterií z kmene *Proteobacteria* (Leiman *et al.* 2009) a je kódován jediným genovým klastrem, složeným z 15 – 20 konzervovaných otevřených čtecích rámců (Bonemann *et al.* 2010). Jednotlivé komponenty sekrečního systému jsou evolučně příbuzné s krčky fágů (Basler *et al.* 2012). Bylo také zjištěno, že tento sekreční systém narušuje membránu hostitelských buněk stejným mechanismem jako bakteriofágy s kontraktálním krčkem (Hu *et al.* 2015) nebo pyociny typu R (Michel-Briand a Baysse 2002) tak, že se

multiproteinovým tubulárním komplexem váží na povrch citlivých buněk a během kontrakce pouzdra vytvářejí otvor do bakteriální nebo eukaryotní membrány rigidní trubičkou s ostrým koncem (Taylor *et al.* 2016).

Bazální ploténka, nejkomplexnější část těchto injekčních systémů, je zodpovědná za rozpoznání hostitelské buňky nebo signálu z prostředí a následnou kontrakci pouzdra. Taylor *et al.* (2016) zjistili, že za změny ve struktuře bazální ploténky během kontrakce u T4 fága jsou zodpovědné proteiny, jejichž ortology byly nalezeny u všech známých kontraktilních injekčních systémů (Taylor *et al.* 2016).

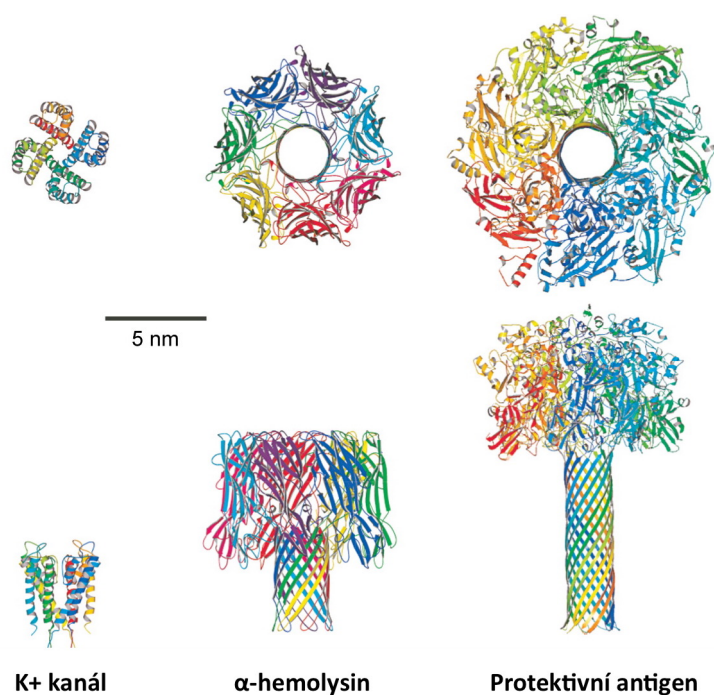
3.3 Analýza molekul pomocí nanopóru

Analýza molekul pomocí nanopórů je metoda fungující na podobném principu jako Coulterovo zařízení, které detekuje a počítá částice, například červené a bílé krvinky nebo krevní destičky v elektrolytu. Počet částic se určuje podle změny elektrického proudu, která nastává ve chvíli, kdy částice prochází malou aperturou. Poklesy elektrického proudu jsou úměrné objemu procházející částice, jejíž vodivost je nižší, než vodivost elektrolytu, který částice obklopuje (Coulter 1953).

Iontové kanály jsou proteiny vázané do membrány, díky kterým je buňka schopna udržovat homeostázi, komunikovat s ostatními buňkami, nebo detekovat přítomnost různých ligandů (Obr. 5) (Kasianowicz a Bezrukov 1995). Iontové kanály zabudované do planárních lipidových membrán (Montal a Mueller 1972) nebo do dvojvrstev na rozhraní kapiček (Funakoshi *et al.* 2006) se používají na detekci a kvantifikaci různých analytů. Nabité molekuly, například jednovláknová DNA nebo RNA, procházejí trvale otevřenými kanály vhodné velikosti díky aplikovanému transmembránovému potenciálu (tedy elektroforeticky) a způsobují blokace proudu (Kasianowicz *et al.* 1996). Tyto proudové poklesy jsou způsobeny snížením vodivosti v důsledku odstranění příslušného objemu elektrolytu z oblasti póru. Blokace iontových kanálů způsobují také proteiny (Movileanu *et al.* 2005) nebo nenabité molekuly, jako například polyethylenglykol, které procházejí pórem difuzí (Bezrukov *et al.* 1996). Proudové blokace trvají akorát tak dlouho, jak dlouho se zdržuje analyt uvnitř póru.

Iontový kanál α -hemolysin (označován také α -toxin) produkovaný bakterií *Staphylococcus aureus* se stal často používaným modelovým systémem pro analýzu molekul díky jeho schopnosti tvořit stabilní, dlouhotrvající kanály (Kasianowicz *et al.* 2008). Toxin je produkován ve formě monomerního polypeptidového řetězce, rozpustného ve vodě. Po

kontaktu s lipidovou membránou monomery oligomerizují a vytváří heptamerní transmembránové póry se strukturou β -barelu. Homooligomerní heptamer je dlouhý 10 nm a jeho vnitřní efektivní průměr se pohybuje v rozmezí 1,4 až 4,6 nm (Bhakdi a Tranum-Jensen 1991; Gouaux *et al.* 1994; Song *et al.* 1996). Na rozdíl od většiny ostatních biologických kanálů vytváří α -toxin v membránách stabilní póry s velkou vodivostí (1 nS), při aplikovaném napětí 100 mV se velikost iontového proudu pohybuje kolem 100 pA v 1 M KCl (Kasianowicz *et al.* 1996; Deamer a Akeson 2000).

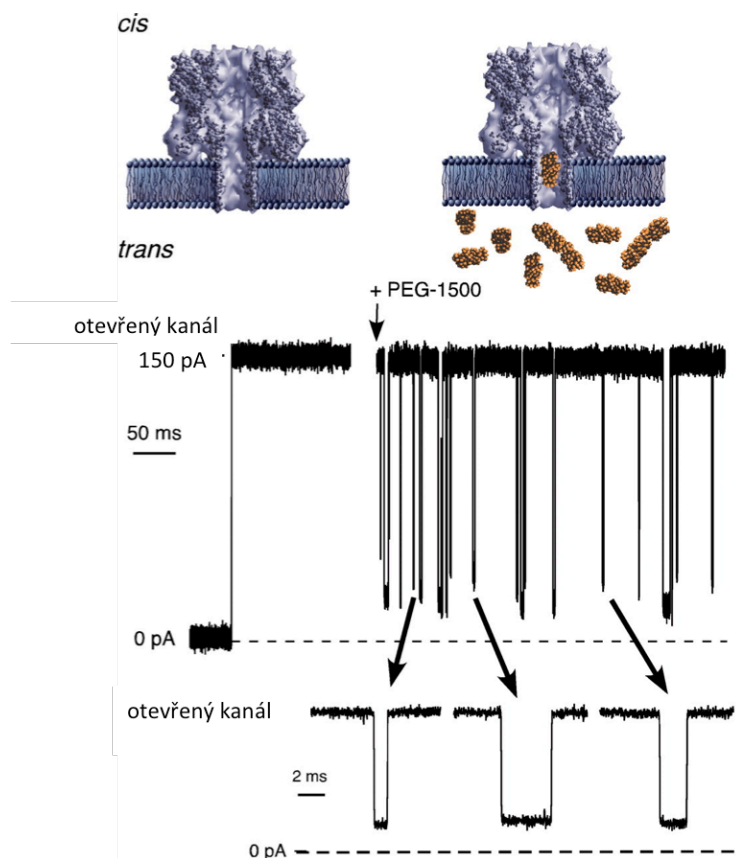


Obr. 5: Biologické nanopóry. Vlevo je krystalová struktura K⁺ selektivního iontového kanálu (ze *Streptomyces lividans*). Uprostřed je struktura heptamerního póru α -hemolysinu, produkovaného bakterií *Staphylococcus aureus*. Vpravo je molekulární model kanálu tvořeného protektivním antigenem 63, produkovaným bakterií *Bacillus anthracis* (Kasianowicz *et al.* 2008).

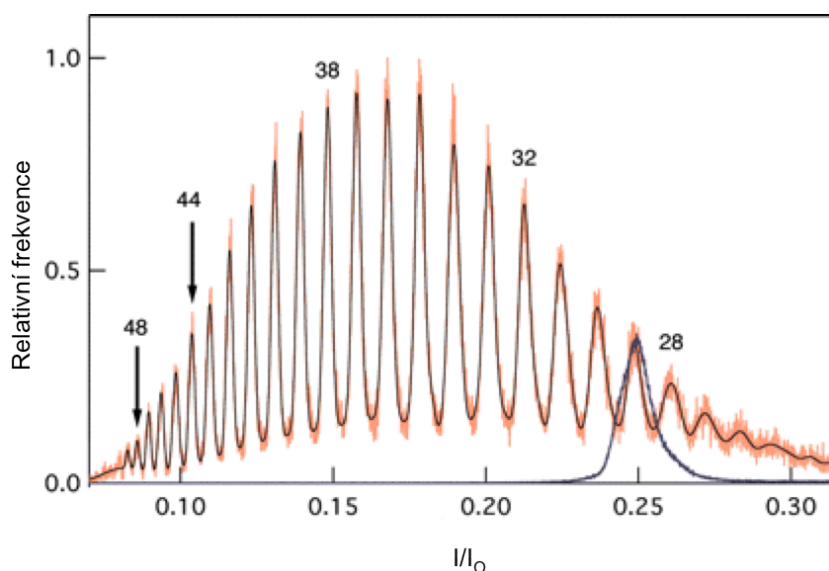
3.3.1 Hmotnostní spektrometrie v roztoku

Nanopóry a koloidní roztoky se využívají dvojím způsobem, který se liší cílem daného pokusu. Prvním cílem je charakterizace tvaru a velikosti póru. Polymery v roztoku snižují iontovou vodivost kanálů v závislosti na jejich velikosti. Polymery s velikostí menší než průměr póru vodivost snižují, zatímco polymery s poloměrem větším, než průměr póru, vodivost kanálu neovlivňují, protože se do něj fyzicky nevejdou (Krasilnikov *et al.* 1995; Krasilnikov 2002). Naopak druhým cílem je detekce a charakterizace částic v roztoku. Na

tom je založena hmotnostní spektrometrie v roztoku, která umožňuje rozlišit pomocí známého a dobře definovaného nanopóru velikost jednotlivých molekul (Robertson *et al.* 2007). Pokles vodivosti způsobený blokací nanopóru polymerem odpovídá velikosti daného polymeru. Větší polymer tedy způsobuje výraznější pokles vodivosti než polymer menší (Kasianowicz *et al.* 2008). Hmotnostní spektrometrie v roztoku využívá schopnosti detekovat i drobné rozdíly v poklesu iontové vodivosti nanopóru (Obr. 6). Robertson *et al.* (2007) analyzovali blokace α -hemolysinového nanopóru způsobené jednotlivými molekulami monodisperzního polyethylenglykolu ($M_w = 1294$ g/mol) a polydisperzního polyethylenglykolu ($M_{w(\text{průměr})} = 1500$ g/mol). Pokud do systému není přidán analyt, tak je proud procházející nanopórem stabilní (I_0) a nedochází k žádným blokacím. Polydisperzní PEG, přidáný na trans stranu membrány, způsobuje dočasné blokace proudu, které odpovídají vstupu jednotlivých molekul do nanopóru. Blokace způsobené polydisperzním polyethylenglykolem se od sebe liší hloubkou a dobou trvání v závislosti na počtu podjednotek polymeru, ze kterých je daná molekula složena. Blokace způsobené monodisperzním polyethylenglykolem jsou vůči sobě uniformní. Aby bylo možné rozlišit odpovídající počty podjednotek, byl vytvořen histogram z průměrných hodnot proudu blokačních událostí (Obr. 7). Histogram rozlišuje 24 různých velikých molekul polyethylenglykolu, jejichž podjednotkové složení se pohybuje v rozmezí 25 až 49 podjednotek. V tomto případě slouží histogram monodisperzního polyethylenglykolu (29 podjednotek) jako kalibrační (Robertson *et al.* 2007; Kasianowicz *et al.* 2008).



Obr. 6: Záznam iontového proudu α -hemolysinového kanálu blokovaného polydisperzním polyethylenglykolem 1500. Přidání polyethylenglykolu k α -hemolysinu v membráně (vrchní obrázek) způsobuje zřetelné blokace proudu jednoho otevřeného kanálu (prostřední a spodní obrázek) (Robertson *et al.* 2007).

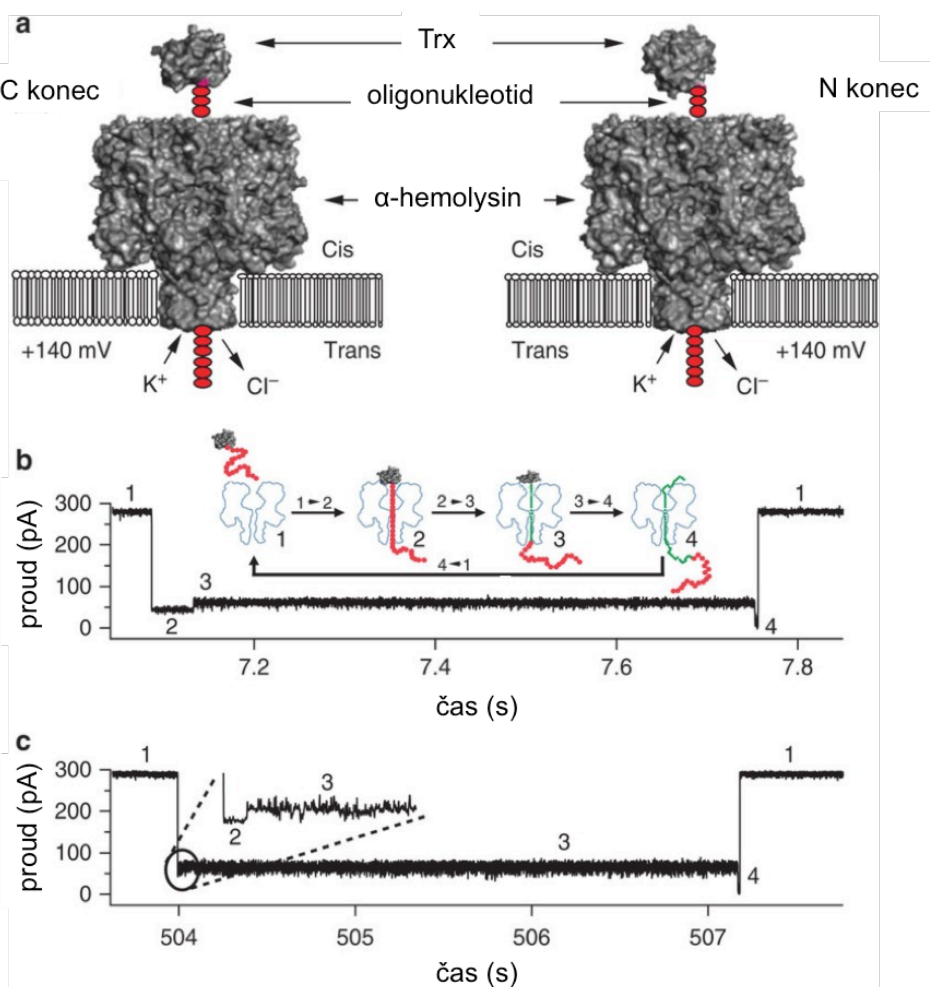


Obr. 7: Hmotnostní spektrum pro polydisperzní PEG. Vyšší hodnoty I/I_0 odpovídají nižším molárním hmotnostem polyethylenglykolu. Histogram zprůměrovaných vodivostí monodisperzního polyethylenglykolu (modře) je nastaven do výšky odpovídajícího vrcholu polydisperzního polyethylenglykolu (Robertson *et al.* 2007).

3.3.2 Detekce a charakterizace proteinů

Biologické i umělé (*solid-state*) nanopóry se dají využít na detekci proteinů v roztoku, kdy můžeme podle hloubky a délky trvání blokad rozlišovat, zda se protein nachází v nativní konformaci, v částečně sbaleném stavu nebo v denaturovaném stavu (Talaga a Li 2009; Pastoriza-Gallego *et al.* 2011). Pomocí nanopórů se dá také sledovat rozbalování proteinů během translokace. Sbalený protein totiž pórem neprochází, jakmile denaturuje, tak prochází v pořadí aminokyselin. Rodriguez-Larrea a Bayley (2014) sledovali, jak se od sebe liší kinetika rozbalování thioredoxinu, pokud tento protein prochází skrz pór α -hemolysinu od N-konce nebo od C-konce. Na jeden z konců proteinu byla připojena krátká oligonukleotidová sekvence DNA, která sloužila k elektroforetickému navedení proteinu do nanopóru vždy od daného konce (N- nebo C-) (Rodriguez-Larrea a Bayley 2013). Blokace iontového proudu způsobené postupným procházením jednotlivých částí proteinu pórem měly v obou případech stejný vzorec, ale lišily se délkou trvání a hloubkou (Obr. 8). Bylo zjištěno, že rozbalování proteinu není závislé na celkové stabilitě proteinu, ale spíše na koncových strukturách, kterými je protein translokován. Tyto pokusy mají význam pro lepší pochopení mechanismu rozbalování proteinů během translokace a sbalování proteinů během syntézy. Také by mohly přispět k vylepšení analýzy proteomů založené na nanopórech (Rodriguez-Larrea a Bayley 2014).

Dalším dobrým modelovým systémem pro zkoumání translokace proteinů skrz membránové póry je antraxový toxin produkovaný bakterií *Bacillus anthracis*. Antraxový toxin je tvořen třemi proteiny: protektivním antigenem (PA), edémovým faktorem (EF) a letálním faktorem (LF) (Collier a Young 2003). Podjednotka protektivního antigenu vytváří heptamerní póry v biologických membránách i v planárních membránových systémech. Tyto póry pak umožňují překonání lipidové dvojvrstvy edémovému a letálnímu faktoru. Antraxový toxin tak může být použit jako citlivý detektor přítomnosti EF a LF nebo jako nanozařízení na charakterizaci potenciálních terapeutických prostředků proti antraxu (Kasianowicz *et al.* 2008). Karginov *et al.* (2005) zabudovali do planární lipidové membrány antraxový heptamerní pór, který blokovali molekulami modifikovaného β -cyclodextrinu. Cyclodextrin, který se vázal do oblasti póru způsoboval blokace téměř na bazální hladinu proudu. Takto blokováným kanálem pak nemohou procházet další komponenty antraxového toxinu – edémový faktor a letální faktor, čímž je snížena patogenita (Karginov *et al.* 2005).



Obr. 8: Rozbalování proteinu během translokace. A. Schéma thioredoxinu naváděného do α -hemolysinového póru od C- a N-konce. B. Záznam proudu ukazující různé proudové úrovně (1-4), které odpovídají rozbalování proteinu během translokace naváděného do póru C-koncem (140 mV, 2M KCl). Číslo 1 značí bazální hladinu proudu otevřeného kanálu. C. Proudové úrovně odpovídající rozbalování proteinu během translokace naváděného do póru N-koncem (Rodriguez-Larrea a Bayley 2014).

3.3.3 Nanopórové sekvenování

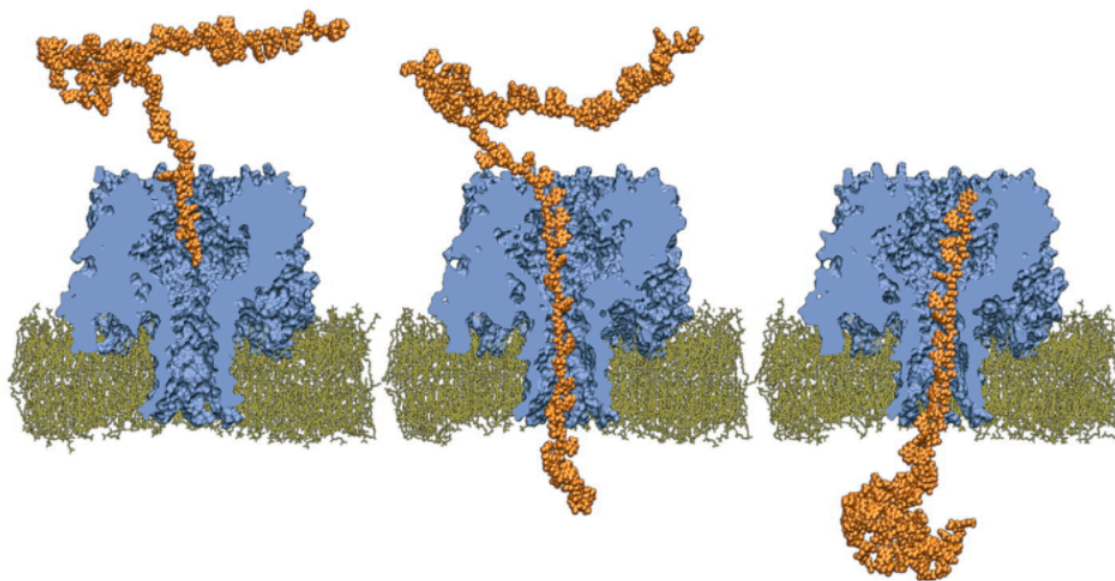
In vitro studie, kdy je zkoumána schopnost jednovláknové DNA nebo RNA procházet nanopórem, se obvykle provádějí na heptamerním proteinu α -hemolysinu. Nanopór je zabudován do membrány, která elektricky izoluje dva kompartmenty s vodivým elektrolytem (Kasianowicz *et al.* 1996).

Záporně nabitě molekuly jednovláknové DNA a RNA procházejí elektroforeticky nanopórem díky aplikovanému transmembránovému potenciálu. Vnitřní průměr α -hemolysinu je akorát tak velký, že umožňuje průchod jednovláknové nukleové kyseliny, takže vlákno DNA nebo RNA prochází pórem v sekvenčním pořadí (Obr. 9). Při průchodu nukleové kyseliny α -hemolysinovým nanopórem je možné detekovat zřetelné poklesy

iontového proudu (Kasianowicz *et al.* 1996). V následných pokusech bylo potvrzeno, že poklesy proudu odpovídají jednotlivým nukleotidům procházejícím pórem. Schopnost detekovat změny proudu byla zkoumána na průchodu RNA homopolymerů, polyadenylové kyseliny a polycytidylové kyseliny α -hemolysinovým nanopórem. Rozdíly, zaznamenané při translokaci těchto homopolymerů prokázaly jistou naději při využití nanopórů jako nástrojů na sekvenování (Akeson *et al.* 1999).

Jednovláknový polynukleotid prochází α -hemolysinovým nanopórem rychlostí přibližně jedna báze za 1-2 μ s. Příliš vysoká rychlost způsobuje problémy s detekcí jednotlivých nukleotidů, protože dochází ke vzniku velkého šumu. Šum je způsoben nízkým počtem iontů procházejících nanopórem, což zhoršuje použitelnost nanopóru jako sekvenovacího zařízení (Kasianowicz *et al.* 2008; Venkatesan a Bashir 2011). Snížení rychlosti průchodu polynukleotidových kyselin nanopórem se dá dosáhnout několika postupy, například zvýšením viskozity elektrolytu (Kawano *et al.* 2009) nebo vytvořením mutantního α -hemolysinu s pozitivně nabitým cyklodextrinovým adaptérem, kovalentně vázaným do β -barelové struktury póru. Takto upravený nanopór je schopen rozlišovat mezi jednotlivými deoxyribonukleotidy a ribonukleotidy (Astier *et al.* 2006). Nanopórové sekvenování má oproti ostatním sekvenovacím metodám několik výhod. Nejpersvědčivější z nich jsou relativně nízká cena a průběh sekvenování v reálném čase, spolu s nízkými nároky na přítomnost různých enzymů, vzhledem k tomu, že sekvenování DNA probíhá i bez nutnosti amplifikace (Bayley 2006).

Dalším biologickým nanopórem, který se dá rovněž použít na sekvenování DNA je MspA porin produkovaný bakterií *Mycobacterium smegmatis* (Butler *et al.* 2008). MspA porin je homooktamerní polypeptid, jehož konformace se podobá poháru. Vodivost tohoto porinu v 1 M KCl je 4 nS (Faller *et al.* 2004). Divoký typ MspA má ve zúžení na vnitřní straně póru negativní náboj, který znemožňuje průchod jednovláknové DNA. Toto omezení bylo eliminováno vytvořením mutant, ve kterých byly nahrazeny tři negativně nabitě asparagové kyseliny za neutrální asparaginy místně specifickou mutagenezí (Butler *et al.* 2008; Derrington *et al.* 2010). Vzhledem k tomu, že je MspA proteinový komplex kratší než α -hemolysin, jeho transmembránová doména je dlouhá pouze 0,5 nm a vnitřní průměr nejužší oblasti měří přibližně 1 nm (Faller *et al.* 2004), tak by měly být změny proudu při blokacích jednotlivými nukleotidy zřetelnější a od sebe snáze odlišitelné v porovnání s α -hemolysinem (Derrington *et al.* 2010).



Obr. 9: Simulace dynamiky průchodu jednovláknového polynukleotidu skrz α -hemolysinový nanopór (Kasianowicz *et al.* 2008).

4 Materiál a metody

4.1 Bakteriální kmeny

V této diplomové práci byly použity následující bakteriální kmeny:

<i>Pragia fontium</i> 24613	divoký kmen produkující fonticiny
<i>Pragia fontium</i> 24647	divoký kmen citlivý k fonticinům
<i>Yersinia enterocolitica</i> 5Ye03	kmen citlivý k fonticinům (National Institute of Public Health)
<i>Yersinia aldovae</i> Y551	kmen citlivý k fonticinům (National Institute of Public Health)
<i>Escherichia coli</i> DH5α	(<i>supE44 ΔlacU169 (φ80lacZ ΔM15) hsdR17 recA1 endA1gyrA96 thi-1relA1</i>) kmen s transformovaným plazmidem pDG1661 : Amp ^R , Cm ^R , Spc ^R , integrativní vektor <i>B. subtilis</i> (Guérout-Fleury <i>et al.</i> 1996).

Bakteriální kmeny byly uchovávány v podobě glycerolových konzerv (15% glycerol) při teplotě -20°C nebo -80°C v případě *E. coli*. Před použitím byly kmeny vyočkovány na Petriho misky s pevným médiem (LB agar), inkubovány ve 30°C po dobu 20 h a následně uskladněny ve 4°C po maximální dobu dvou týdnů.

4.2 Kultivační media

LB médium

- Kvasničný autolyzát (Oxoid) 5 g/l
- Pepton (Oxoid) 10 g/l
- Chlorid sodný (Lach-Ner) 5 g/l
- Destilovaná voda

LB agar

- Agar (HiMedia) 12 g/l
- Kvasničný autolyzát (Oxoid) 5 g/l
- Pepton (Oxoid) 10 g/l
- Chlorid sodný (Lach-Ner) 5 g/l
- Destilovaná voda

LB Top agar

- Agar (HiMedia) 7 g/l
- Kvasničný autolyzát (Oxoid) 5 g/l
- Pepton (Oxoid) 10 g/l
- Chlorid sodný (Lach-Ner) 5 g/l
- Destilovaná voda

Složky médií byly rozpuštěny v destilované vodě. Následně bylo upraveno pH na hodnotu 7,00 přidáním roztoku NaOH (koncentrace 1 M). Roztok byl doplněn destilovanou vodou do požadovaného objemu a následně sterilizován v autoklávu při tlaku 0,1 MPa po dobu 20 min. Po sterilizaci byla do médií přidána antibiotika v příslušné koncentraci, pokud byla potřeba.

4.3 Kultivace bakteriálních kultur

Noční kultura byla asepticky zaočkována z biomasy na pevném médiu (LB agar) do 30 ml LB média v Erlenmayerově baňce a aerobně kultivována přes noc v horkovzdušné třepačce NB-205 (N-BIOTEK) při 30°C a 160 rpm. Z narostlé noční kultury byla poté zočkována ranní kultura na $OD_{450} = 0,05$. Ranní kultura byla kultivována za stejných podmínek (30°C a 160 rpm) do $OD_{450} = 0,5$. Narostlá bakteriální kultura v exponenciální fázi růstu byla centrifugována 15 min při 4500g a 4°C, promyta pufrům a následně resuspendována v příslušném pufru.

4.4 Produkce fonticinů

Materiál:

Mitomycin C (Sigma-Aldrich)

Produkce fonticinů probíhala podle původního protokolu (Šmarda a Benada 2005) tak, že byl k ranní kultuře *P. fontium* 24613 (po dosažení $OD_{450} = 0,5$) přidán mitomycin C v koncentraci 1 µg/ml. Kultura byla dále kultivována za stejných podmínek (30°C a 160 rpm) ještě 4 hodiny. Následně byla kultura centrifugována (15 min, 4500g, 4°C) a získaný supernatant byl filtrován (filtry Millitex s velikostí pórů 0,22 µm, Millipore). Takto připravené vzorky byly uchovávány ve 4°C. Po obtížích s dosahováním reprodukovatelných výsledků tímto způsobem indukce tvorby fonticinů jsme fonticiny začali produkovat podle

protokolu, který se používá na indukci tvorby enterokoliticinů (Strauch *et al.* 2001). Odlišnost od původního protokolu je zde pouze v délce kultivace bakteriální kultury po přidání mitomycinu C a v teplotě kultivace. Indukce tedy probíhá 14 h při 20°C a 160 rpm. Poté jsou buňky centrifugovány a vzniklý supernatant je filtrován. Filtrované fonticiny byly dále uchovávány v -80°C a před každým použitím byly sonikovány na ledu 3krát 10 pulzů o délce 1 s na 40 % výkonu sonikátoru (Bandelin Sonoplus ultrasonic homogenizer, Sigma-Aldrich).

4.5 Inhibiční zóny

Schopnost fonticinů inhibovat růst bakteriálních buněk jsme testovali pomocí tvorby inhibičních zón kolem kapky fonticinů na pevném médiu. Noční inokulum požadovaného bakteriálního kmene o objemu 100 µl bylo smícháno se 3 ml rozehrátého LB Top agaru, směs byla promíchána na laboratorním přístroji vortex a nalita na Petriho misky s LB agarem. Po zatuhnutí byly na Top agar nanášeny 3 µl vzorku koncentrovaných nebo ředěných fonticinů. Petriho misky byly kultivovány dnem vzhůru při teplotě 30°C alespoň 16 h.

4.6 Černé lipidické membrány

Materiál:

Dekan (≥99%, Sigma-Aldrich)

Butanol (≥99%, Fluka)

Pentan (≥99%, Sigma-Aldrich)

Etanol (96%, Penta)

Chloroform (≥99%, Sigma-Aldrich)

Hovězí sérový albumin - BSA (Sigma-Aldrich)

PEG 8000 (Sigma-Aldrich)

PEG 1251,5 (Sigma-Aldrich)

Částice nanodiamantů – DNP (NanoAmando, New Metals and Chemicals Corp. Ltd.)

Lipidy: sojový azolectin (Azolectin 1114, Fluka)

fosfolipidový extrakt z *E. coli* (Avanti Polar Lipids)

Měřicí pufr: 1M NaCl (10mM nebo 100mM NaCl), 5mM Tris-HCl, 8mM MgCl₂, pH 7,3

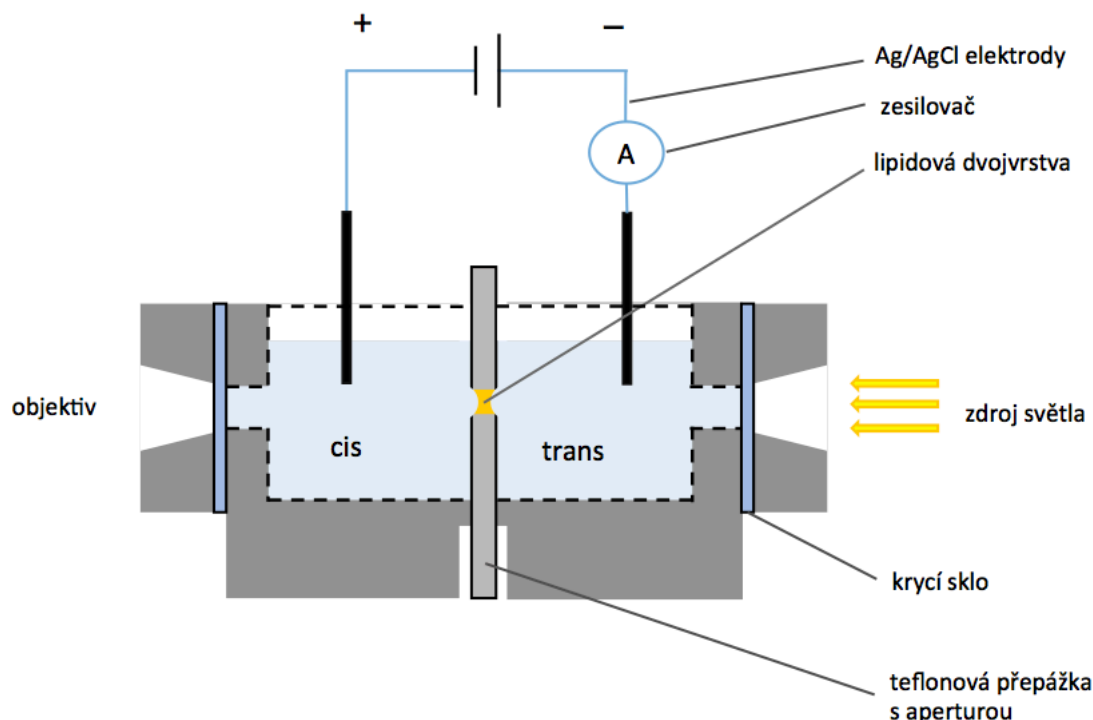
Černé lipidické membrány (*Black lipid membranes*) je metoda, která umožňuje zkoumání a charakterizaci zjednodušených membránových systémů a jejich interakci s pórtovnými proteiny. Tato metoda byla poprvé popsána již před více než padesáti lety. Název získala zmíněná metoda podle toho, že se v odraženém světle jeví fosfolipidové membrány jako černé, k čemuž dochází díky interferenci světla na rozhraní mezi lipidovou dvojvrstvou a vodou (Tien a Dawidowicz 1966).

Měřicí aparatura (Obr. 10) je tvořena teflonovou kyvetou, která je rozdělena teflonovou přepážkou na dva kompartmenty. Uprostřed teflonové přepážky je malá apertura. Do obou kyvetových prostorů naplněných pufrem jsou zavedeny Ag/AgCl elektrody, kterými je vkládán potenciál na membránu. Černé lipidické membrány se dají vytvářet dvěma různými způsoby. První metoda, takzvaná *painting*, spočívá v tom, že se lipidy rozpuštěné v organickém rozpouštědle nanášejí pomocí štětečku nebo kličky přes apertura v teflonové přepážce (Mueller *et al.* 1962). Tímto způsobem vznikají velmi stabilní membrány. Jedinou nevýhodou tohoto uspořádání je trvalý obsah organického rozpouštědla mezi dvojvrstvou, které zvětšuje tloušťku membrány. Druhá metoda se nazývá Montal-Muellerova a provádí se tak, že se na povrch vodného pufru v obou kyvetových prostorech nanese vrstva lipidů. Postupně se potom zvedá hladina vodného pufru na obou stranách až nad úroveň aperture (Montal a Mueller 1972). Tímto způsobem sice vznikají dvojvrstevné membrány, které neobsahují rozpouštědlo, zato je ale metoda náročnější na provedení. Výhodou tohoto uspořádání je také možnost vytvářet asymetrické membrány (Winterhalter 2000).

Dvojvrstevná membrána dokonale elektricky izoluje kyvetové prostory, takže jakékoliv narušení membrány se projeví jako skoková změna zaznamenávaného proudu. Elektrický proud procházející membránou byl zaznamenáván pomocí 10 GV/A zesilovače (Femto), záznamové PCI karty KPCI - 3108 (Keithley Instruments) a specializovaného programu BLM2, vytvořeného na míru na MFF UK doc. RNDr. Jiřím Bokem, Csc.

Teflonová kyveta (vyrobena na zakázku firmou Sipoch) byla před každým použitím omyta proudem vody, destilovanou vodou, etanolem a následně vysušena pentanem. Teflonová přepážka byla rovněž omyta destilovanou vodou a etanolem. Důkladným omýváním je kyveta zbavena nečistot a zbytků lipidů, čímž se dá snížit riziko kontaminace. Po uschnutí byla aparatura sestavena a do obou kyvetových prostorů bylo napipetováno 1,5 ml měřicího pufru. Před každým měřením bylo kontrolováno napětí na elektrodách, které by mělo být nulové. Následně byl nastaven membránový potenciál, obvykle na 50 mV. Přes apertura o ploše asi 0,6 mm² byly nanášeny lipidy metodou *painting*. Lipidy byly nanášeny

pomocí skleněné špendlíkové hlavičky z předem připraveného 3% (w/v) roztoku fosfolipidů, rozpuštěných v dekanu s butanolem v poměru 9:1 (v/v).



Obr. 10: Schéma měřící aparatury (Pinkas 2015).

4.6.1 Analýza jednotlivých vodivostních událostí

Během měření byl v čase zaznamenáván elektrický proud a napětí aplikované na membránu. Získaná data pak byla manuálně vyhodnocována pomocí programu QuB (<https://www.qub.buffalo.edu>). V QuB lze pomocí nastavení vhodného filtru (např. 10 Hz) odstranit přebytečný šum v záznamu.

Hladina elektrického proudu procházejícího intaktní membránou je považována za bazální. Po narušení membrány zabudováním póru dochází k náhlým skokovým nárůstům elektrického proudu. Tyto nárůsty jsou detekovány a zpracovávány podle následujícího vzorce:

$$G = \frac{I}{U}$$

kde G je vodivost a udává se v jednotkách Siemens [S], I je elektrický proud v Ampérech [A] a U je vložené napětí ve Voltech [V]. Podobným způsobem jsou vyhodnocovány i blokace proudu v již vytvořeném póru.

Hodnoty vodivostí jednotlivých vodivostních událostí kanálů, byly dále zpracovány vytvářením histogramů pomocí metody jádrového odhadu (*Kernel Density Estimation*). Jedná se o neparametrický způsob odhadu hustoty distribuce pravděpodobnosti náhodných proměnných. Ve srovnání s běžným histogramem je vynesení dat hladší a přesněji se prokládá funkcemi, protože poskytuje k dispozici více bodů v histogramu (Rosenblatt 1956; Parzen 1962).

4.7 Sledování permeabilizace membrány pomocí vstupu fluorescenční sondy do buňky

Materiál:

Propidium jodid (Sigma-Aldrich); zásobní roztok 20mM

Měřicí pufr: 10mM HEPES, 0,5% glukóza, pH 7,2 (upraveno pomocí NaOH)

Tato fluorescenční metoda umožňuje sledovat permeabilizační aktivitu látky na živých buňkách v reálném čase. Ranní kultura *Y. enterocolitica* Y551 byla napěstována do $OD_{450} = 0,5$ a promyta HEPES pufrém s glukózou. Promyté buňky byly resuspendovány v pufru do $OD_{450} = 0,5$. Takto připravené buňky byly ředěny v kyvetě pufrém na $OD_{450} = 0,1$ do objemu 1,8 ml. Do kyvety byl přidán 1 μ l propidium jodidu na výslednou koncentraci 10 μ M.

Měření fluorescence probíhalo na přístroji Fluoromax-3 (Jobin-Yvon, Horiba) v kyvetách z křemenného skla. Vlnová délka excitačního záření byla 480 nm a intenzita fluorescence emise byla měřena při 515 nm. Nejprve bylo měřeno pozadí každého vzorku, tedy buňky s propidium jodidem, a po krátké chvíli byl přidán objem fonticinů ředěný LB médiem tak, aby byl přídavek vždy 200 μ l. Obsah kyvety byl míchán magnetickým míchátkem po celou dobu měření. Teplota systému byla udržována na 30°C po celou dobu měření. Naměřené kinetiky byly dále zpracovávány pomocí programu Fityk (<http://fityk.nieto.pl>).

4.8 Izolace bakteriálních lipidů

Materiál:

Biomasa v exponenciální fázi růstu: *Y. enterocolitica* Y551, *P. fontium* 24613, 24647

K₂HPO₃ (Roth) 0,2 M

KH₂PO₃ (Fluka) 0,2 M

Hexan (HPLC grade, Sigma-Aldrich)

Izopropanol (LC-MS grade, Fluka)

Chloroform (≥99%, Sigma-Aldrich)

Filtry Whatman GF/C 25 mm

Buněčný pufr: 50 mM fosfátový pufr, pH 8,0 (94,7 ml 0,2 M K₂HPO₃, 5,3 ml 0,2 M KH₂PO₃, doplněno destilovanou vodou do 400 ml)

Buněčná biomasa o objemu 800 ml v exponenciální fázi růstu (OD₄₅₀ = 0,5) byla centrifugována 15 min při 4500g a 4°C a následně dvakrát promyta vychlazeným buněčným pufrem. K promytým buňkám v teflonových centrifugačních zkumavkách bylo přidáno 30 ml směsi izopropanolu a hexanu v poměru 2:3 (v/v). Buněčný pelet byl resuspendován v rozpouštědlech intenzivním mícháním na přístroji vortex; extrakce lipidických složek probíhala přes noc ve 4°C. Následnou centrifugací (10 min, 5000g, 4°C) došlo k odstranění nelipidických složek z extraktu. Poté byl extrakt odpařen na rotační vakuové odparce (RVO 400, Ingos) při 38°C. K lipidové složce bylo přidáno 7,5 ml chloroformu a tato směs byla přefiltrována přes skleněný filtr Whatman. Filtr byl následně ještě promyt 2,5 ml chloroformu a oba filtráty byly spojeny. Filtrací byla lipidická složka zbavena nelipidových nečistot, které se nerozpustily v chloroformu. Chloroform byl poté odpařen na vakuové odparce. Izolované lipidy byly opět v chloroformu převedeny do skleněných vial s teflonovým víčkem (Restek), chloroform byl odstraněn pod proudem plynného dusíku a lipidy byly uchovány v -80°C.

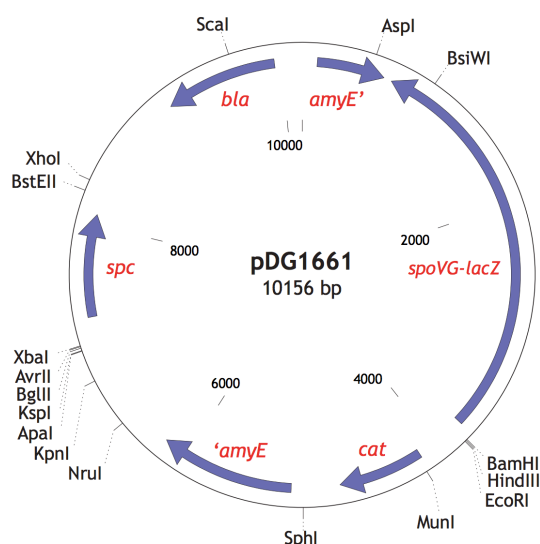
4.9 Izolace plazmidové DNA

Materiál:

Komerční sada	<i>High Pure Plasmid Isolation Kit</i> (Roche)
RNáza A	(2,5 mg ve 25 ml suspenzního pufru)
Suspenzní pufr	(<i>Suspension Buffer</i> : 25 ml, 50mM Tris-HCl, 10mM EDTA, pH 8)
Lytický pufr	(<i>Lysis Buffer</i> : 25 ml, 0,2M NaOH, 1%SDS)
Vazebný pufr	(<i>Binding Buffer</i> : 25 ml, 4M guanidin hydrochlorid, 0,5M octan draselný, pH 4,2)
Promývací pufr I	(<i>Wash Buffer I</i> : 33 ml, 5M guanidin hydrochlorid, 20mM Tris-HCl, 20 ml etanol, pH 6,6)
Promývací pufr II	(<i>Wash Buffer II</i> : 10 ml, 20mmol NaCl, 2mM Tris-HCl, 40 ml etanol pH 7,5)
Eluční pufr	(<i>Elution Buffer</i> : 40 ml, 10mM Tris-HCl, pH 8,5)
Ampicilin sodium salt (Sigma); zásobní roztok 50 mg/ml H ₂ O	

Plazmidová DNA byla izolována pomocí komerční sady *High Pure Plasmid Isolation Kit* od firmy Roche. Buňky *Escherichia coli* s transformovaným plazmidem pDG1661 (Obr. 11) byly z konzervy vyočkovány na Petriho misky s LB agarem a ampicilinem (100 µg/ml), růst 35 h při 37°C. *E.coli* byla následně kultivována přes noc v LB médium s ampicilinem (100 µg/ml) při 37°C do OD₆₀₀ = 2,25. Noční inokulu o objemu 2 ml bylo přeneseno do sterilních mikrozkušavek Eppendorf a centrifugováno (4500g, 15 min, 4°C). Sediment buněk byl resuspendován ve 250 µl rozpuštěné RNázy a promíchán. Poté bylo ke směsi přidáno 250 µl lytického pufru a opatrným převrácením zkumavky byly roztoky promíchány. V této chvíli došlo k lýzi buněk a rozrušení buněčné stěny. Směs se inkubovala 5 minut při laboratorní teplotě, poté bylo do mikrozkušavky přidáno 350 µl vychlazeného vazebného pufru, směs byla opatrně promíchána a inkubovala se na ledu po dobu 5 min. Následně proběhla centrifugace na stolní centrifuze po dobu 10 min při 13000g. Supernatant byl přenesen do filtrační zkumavky (*High Pure Filter Tube*), vložené do sběrné zkumavky a centrifugován 1 min při 13000g. Obsah sběrné zkumavky, tedy přefiltrovaný supernatant, byl vylit a filtrační aparatura opět sesazena. Do filtrační zkumavky bylo přidáno 500 µl promývacího pufru I a směs byla centrifugována 1 min při 13000g. Obsah sběrné zkumavky byl opět vylit a filtrační aparatura, kam bylo přidáno 700 µl promývacího pufru II, opět

sesazena. Následně byla směs centrifugována dvakrát po dobu 1 min při 13000g. Sběrná zkuševka byla vyhozena a filtrační zkuševka, obsahující plazmidovou DNA v peletu, byla vložena do sterilní mikrozkuševky Eppendorf o objemu 1,5 ml, do které bylo přidáno 100 µl elučního pufru. Směs byla centrifugována 1 min při 13000g. Izolovaná DNA byla uchována v -20°C. Čistota a koncentrace izolované plazmidové DNA byla testována pomocí gelové elektroforézy.



Obr. 11: Mapa integrativního plazmidového vektoru pDG1661, který byl použit jako zdroj DNA pro pokusy na černých lipidických membránách. V restrikčním místě EcoRI byl plazmid štěpen příslušnou restriktázou tak, abychom získali lineární DNA (Guérout-Fleury *et al.* 1996).

4.10 Srážení DNA etanolem

Materiál:

96% etanol

70% etanol

3 M octan draselný (pH 4,8 upraveno kyselinou octovou)

Izolovaná plazmidová DNA byla přečištěna srážením etanolem. Ke 100 µl DNA v mikrozkuševce Eppendorf bylo přidáno 10 µl octanu draselného a 220 µl čistého etanolu, vychlazeného na -20°C. Srážení směsi probíhalo po dobu 15 min v -20°C. Následně byla směs centrifugována (17500g, 5 min, 4°C). Pelet byl promyt dvěma objemy 70% etanolu a následně centrifugován (17500g, 5 min, 4°C). Pelet byl vysušen v exikátoru a dále zpracováván podle následujícího protokolu – Restrikční štěpení plazmidové cDNA.

4.11 Restrikční štěpení plazmidové cDNA

Materiál:

SuRE/Cut Buffer H 10x koncentrovaný (Roche, Sigma-Aldrich)

Restrikční enzym EcoRI (Roche, Sigma-Aldrich)

Plazmidová cirkulární DNA byla linearizována pomocí restrikčního enzymu EcoRI. DNA přesrážená etanolem byla rozpuštěna v 10 μ l SuRE/Cut pufru a 90 μ l destilované vody. K roztoku byly přidány 2 μ l restrikčního enzymu EcoRI, který specificky štěpí DNA a vytváří fragmenty s kohezními konci. Roztok byl promíchán na laboratorním přístroji vortex a odebrán 1 μ l roztoku v čase t_0 . Restrikce probíhala po dobu 18 h při teplotě 37°C. Poté byl ze vzorku opět odebrán 1 μ l roztoku v čase t_1 a přidány další 2 μ l restrikčního enzymu. Restrikce probíhala ještě dalších 7 h při teplotě 37°C. Po ukončení štěpení DNA byl odebrán vzorek roztoku (čas t_2) a linearizovaná DNA byla uložena do -20°C. Přítomnost linearizované DNA ve vzorcích odebraných v časech t_0 , t_1 , a t_2 byla ověřena pomocí gelové elektroforézy.

4.12 Purifikace DNA

Materiál:

Komerční sada *High Pure PCR Product Purification Kit* (Roche)

Vazebný pufr (*Binding Buffer*)

Promývací pufr (*Wash Buffer*)

Eluční pufr (*Elution Buffer*)

Izolovaná plazmidová DNA byla purifikována pomocí komerční sady *High Pure PCR Product Purification Kit* od firmy Roche. Ke vzorku o objemu 100 μ l bylo přidáno 500 μ l vazebného pufru a vše bylo důkladně promícháno. Vzorek byl přenesen do filtrační zkumavky, která byla vložena do sběrné zkumavky a následně centrifugován 1 min při 13000g. Obsah sběrné zkumavky byl vylit, filtrační aparatura opět sestavena. Vzorek byl promyt nejprve 500 μ l promývacího pufru I, centrifugován a následně promyt 200 μ l promývacího pufru II a opět centrifugován (1 min, 13000g). Sběrná zkumavka byla vyhozena. Do filtrační zkumavky, vložené do sterilní mikrozukavky Eppendorf, bylo přidáno 100 μ l elučního pufru a celá směs byla centrifugována (1 min, 13000g). Izolovaná DNA byla uchována v -20°C. Čistota a koncentrace izolované plazmidové DNA byla testována pomocí gelové elektroforézy.

4.13 Gelová elektroforéza

Materiál:

Agaróza (Serva)

Ethidium bromid (Boehringer); zásobní roztok: 10 mg/ml H₂O

Standard molekulových hmotností DNA (*GeneRuler DNA Ladder Mix*, Fermentas)

Nanášecí pufr: Brophenol Blue 1 ml (10 mg/ml H₂O), 0,5M EDTA 1,2 ml, 10% SDS 600 µl, glycerol 1,2 ml, dH₂O 6 ml)

TAE pufr: 2 M Tris-acetát, 50 mM EDTA, pH 8 - zásobní roztok: 50x koncentrovaný

Gelová elektroforéza je metoda pro separaci RNA, DNA a proteinů. Makromolekuly jsou rozdělávány na základě velikosti, uspořádání a náboje. V laboratořích se pro separaci běžně používají agarózové gely o koncentraci 0,5% až 4%. Pro ověření přítomnosti plazmidové DNA ve vzorku byl použit 0,6% agarózový gel ve směsi s ethidium bromidem (10 µg/ml). Ethidium bromid je interkalační činidlo, které se vmezuje mezi páry bazí DNA. Po ozáření DNA s navázaným ethidium bromidem ultrafialovým světlem dochází k emisi světla, což umožňuje detekci separovaných makromolekul. Agarózový gel byl ponořen do TAE pufru naředěného 50x. Na gel byl nanesen standard molekulových hmotností DNA, izolovaná plazmidová DNA, naštěpená plazmidová DNA a kontrolní plazmidy, spolu s nanášecím puffrem v poměru 1:1 (v/v). Separace fragmentů DNA probíhala 1 h při aplikovaném napětí 90 V (zdroj od firmy Life Technologies). Výsledky separace v agarózovém gelu byly vizualizovány UV transiluminátorem TXC-20.M a zaznamenány fotoaparátem Olympus Camedia C4000.

4.14 Transmisní elektronová mikroskopie – negativní barvení

Materiál:

1% molybdenan amonný

5% octan uranylu

měděné síťky pokryté formvarovou uhlíkovou blánou

Fonticinové částice jsme vizualizovali pomocí transmisního elektronového mikroskopu. Vzorky byly připraveny metodou negativního kontrastu. Na přípravu vzorku byly použity fonticiny produkované do média po indukci mitomycinem C (14 h, 20°C). Suspenze fonticinů byla nakapána na měděné síťky pokryté formvarovou uhlíkovou blánou.

Adheze probíhala 1 min, potom byl vzorek odsát kouskem filtračního papíru. Následně byl vzorek negativně barven 1% molybdenanem amonným, který byl nakapán na síťku a adheroval 10 min. Vzorek byl vysušen filtračním papírem a kontrastován nanesením 5% octanu uranylu na síťku na dobu 2 min. Následně byl vzorek opláchnut destilovanou vodou a vysušen. Fonticiny byly vizualizovány transmisním elektronovým mikroskopem JEOL JEM-1011 s CCD kamerou (Veleta), pomocí akvizčního softwaru Olympus Soft Imaging GmbH.

5 Výsledky

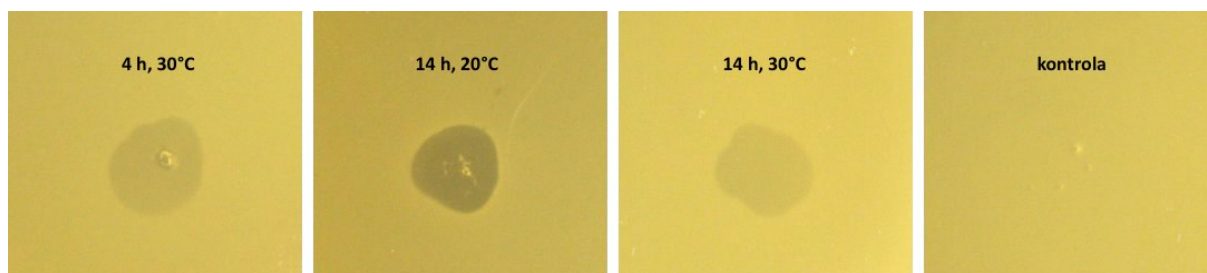
Cílem mé diplomové práce bylo ověření inhibičních účinků fonticinů na citlivých bakteriálních buňkách a charakterizace jejich pórtvorných účinků.

5.1 Indukce produkce fonticinů

Aby bylo možné ověřit schopnost fonticinů reprodukovatelně inhibovat růst citlivých bakteriálních buněk, bylo nutné najít nejlepší způsob, jakým budou fonticiny produkovány. Nejprve jsme pracovali se vzorky izolovaných fonticinů z brněnské laboratoře (Laboratoř bakteriální genetiky a genomiky, LF MU), kde byly vzorky získány srážením supernatantu s vyprodukovanými fonticiny polyethylenglykolem 8000 a rozpuštěny v SM pufru. Některé vzorky byly dále purifikovány centrifugací v gradientu CsCl a následně dialyzovány proti SM pufru. Tyto vzorky byly nestabilní a postupem času docházelo ke ztrátě aktivity jak na živých buňkách, tak *in vitro* na černých lipidových membránách. K tomu docházelo pravděpodobně proto, že při převozu byly vzorky vystaveny nestabilním teplotám kolem 0°C a následně byly uskladněny ve 4°C. Z těchto důvodů bylo nutné zavést produkci a purifikaci fonticinů v naší laboratoři. Podle protokolu, který se používá v brněnské laboratoři (Šmarda a Benada 2005) jsme nejprve indukovali produkci fonticinů přidáním mitomycinu C (1 µg/ml) ke kultuře produkčního kmene (*P. fontium* 24613 v LB médiu) v exponenciální fázi růstu. Indukce pak probíhala 4 h při 30°C a 160 rpm. Po indukci byla bakteriální kultura centrifugována a supernatant byl sterilizován filtrací (filtry Millex GS s velikostí póru 0,22 µm, Millipore). Fonticiny indukované tímto způsobem sice byly aktivní na citlivém kmeni, ale jejich aktivita nebyla příliš vysoká. Proto jsme vyzkoušeli protokol, který se používá na indukci produkce enterokoliticinů, bakteriocinů odvozených z fágů, produkovaných bakterií *Yersinia enterocolitica* (Strauch *et al.* 2001). V tomto protokolu probíhá indukce mitomycinem C po dobu 14 h, avšak za snížené teploty 20°C při 160 rpm. Fonticiny v supernatantu pak byly opět filtrovány. Pro kontrolu jsme zkusili produkovat fonticiny mitomycinem C 14 h i při 30°C a 160 rpm.

Nejzřetelnější a nejreprodukovatelnější inhibiční zóny na citlivém kmeni tvořily fonticiny po 14h indukci při 20°C (Obr. 12). Tento protokol jsme od té doby použili při všech dalších produkcích. Abychom vyloučili možnost, že baktericidní účinek je způsoben pouze působením antibiotika - mitomycinu C, který byl přítomný ve všech supernatantech, testovali jsme tvorbu inhibiční zóny na citlivém kmeni pouze směsí LB média s mitomycinem C v koncentraci 1 µg/ml. Mitomycin v této koncentraci netvořil inhibiční zóny, což naznačuje,

že pozorované baktericidní účinky jsou způsobeny opravdu fonticiny. Jako další kontrolu jsme testovali indukci tvorby fonticinů u citlivého kmene *P. fontium* 24647 (indukce mitomycinem C, 14 h, 20°C, 160 rpm). V tomto případě k produkci fonticinů nedocházelo, což bylo v souladu s očekáváním.



Obr. 12: Porovnání účinku fonticinů při různém typu indukce, vždy v přítomnosti mitomycinu C v koncentraci 1 µg/ml. Inhibiční zóny byly tvořeny na citlivém kmenu *P. fontium* 24647. Fonticiny indukované mitomycinem C po 4 h při 30°C tvořily zakalené inhibiční zóny, podobně tak jako indukce po 14 h při 30°C. Naopak chladová indukce, která probíhala 14 h při 20°C tvořila čirou inhibiční zónu. Kontrolní vzorek obsahoval LB médium a mitomycin C v koncentraci 1 µg/ml.

V literatuře se v souvislosti s produkcí fágům podobných partikulí často setkáváme s indukcí pomocí UV záření. Tento postup jsme se rozhodli vyzkoušet, zejména kvůli snížení spotřeby mitomycinu C pro produkci aktivních fonticinů. Podle protokolu již testovaného na fonticinech (Šmarda a Benada 2005) jsme na vzorky produkčního kmene *P. fontium* 24613 svítili UV lampou (Phillips TUV 15 W, 254 nm) ze vzdálenosti 50 cm po dobu 15, 30, 60 a 120 s. Buňky byly během vystavení UV záření v tenké vrstvě na Petriho misce. Produkce fonticinů potom probíhala 4 h ve 30°C při 160 rpm, k tomuto typu indukce nebyl přidáván mitomycin C.

Aktivitu produkovaných fonticinových částic, indukovaných UV zářením a mitomycinem C za různých teplot, jsme následně testovali vytvářením inhibičních zón na několika bakteriálních kmenech z čeledi *Enterobacteriaceae*; a to na produkčním kmeni *P. fontium* 24613, citlivém kmeni *P. fontium* 24647 a na kmenech *Yersinia enterocolitica* Y551 a *Yersinia aldovae* 5Ye03 (Tab. 1).

Tab. 1: Tabulka citlivosti kmenů k fonticinům, indukovaným mitomycinem C a UV zářením.

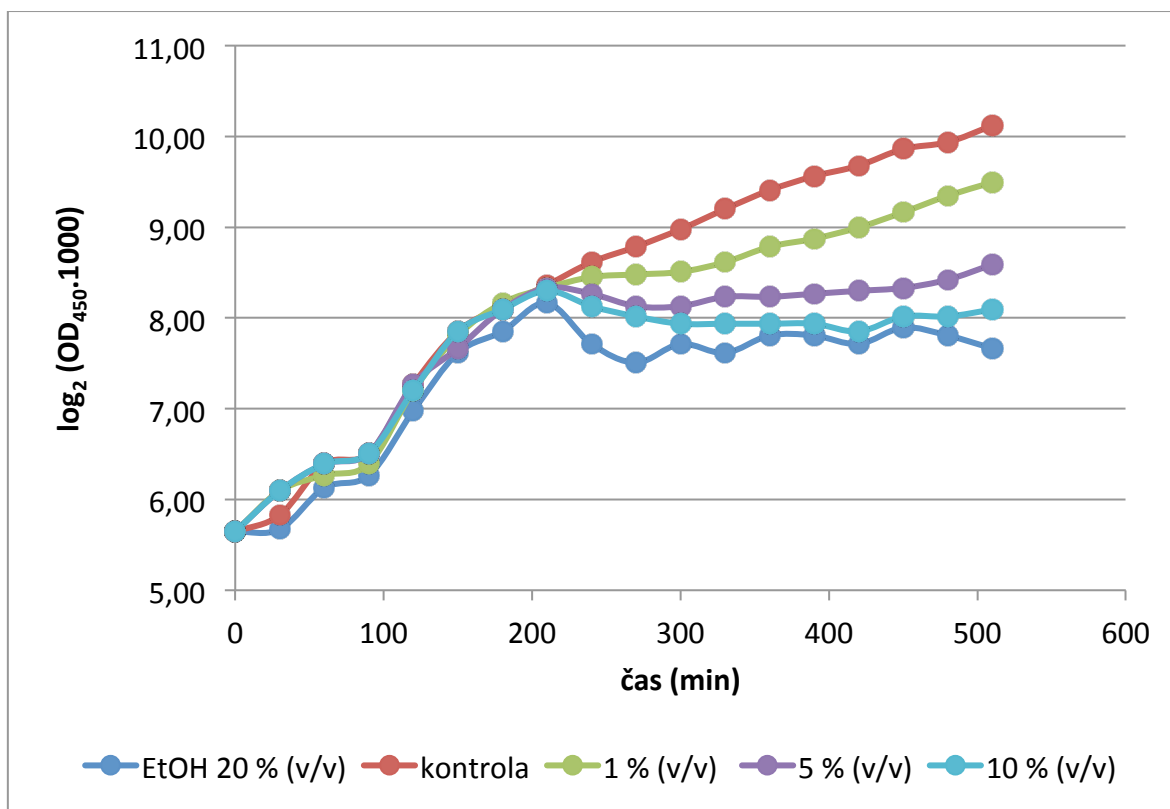
	Indukce produkce fonticinů, <i>P. fontium</i> 24613			
citlivé kmeny	Mitomycin C: 4 h, 30°C	Mitomycin C: 14 h, 20°C	Mitomycin C: 14 h, 20°C	UV 60 s
<i>P. fontium</i> 24613	-	-	-	-
<i>P. fontium</i> 24647	+	+	-	-
<i>Y. aldovae</i> 5Ye03	+	+	-	-
<i>Y. enterocolitica</i> Y551	+	++	-	-

Vysvětlení symbolů: + znamená tvorbu inhibiční zóny, ++ značí prakticky čirou zónu, - naopak nárůst bez inhibice.

Z tabulky plyne, že produkční kmen *P. fontium* 24613 není citlivý ke svým vlastním fonticinům. Nejvyšší citlivost projevily citlivý kmen *P. fontium* 24647 a *Yersinia enterocolitica* Y551 při inhibici růstu fonticiny, které byly indukovány po dobu 14 h ve 20°C. Vzhledem k vysoké citlivosti buněk *Yersinia enterocolitica* Y551 jsme v následujících pokusech používali jako reportérový kmen právě tyto buňky spolu s citlivým kmenem *P. fontium* 24647. Indukce fonticinů pomocí UV záření nebyla aktivní na žádném z testovaných kmenů. Při pozdějším testování takto produkovaných fonticinů na elektronovém mikroskopu jsme zjistili, že k produkci fonticinů po ozáření UV světlem dochází (viz kapitola 5.3.1). Pravděpodobně ale byla produkce fonticinů příliš nízká na to, aby docházelo ke zřetelnému baktericidnímu účinku.

5.2 Vliv koncentrace fonticinů na schopnost inhibovat růst citlivých buněk

Na citlivém kmeni *Pragia fontium* 24647 jsme testovali, jestli je baktericidní účinek fonticinů závislý na jejich koncentraci. Rostoucí kultura v exponenciální fázi růstu ($OD_{450} = 0,3$) byla rozdělena do pěti Erlenmayerových baněk, do kterých bylo přidáno: 20 % (v/v) etanolu, 10 % (v/v) fonticinů, 5 % (v/v) fonticinů a 1 % (v/v) fonticinů. Fonticiny byly přidávány ve formě filtrovaného supernatantu po indukci mitomycinem C. Poslední kultivační banka zůstala bez přídavku jako kontrolní (Obr. 13).



Obr. 13: Inhibice růstu citlivého kmene. Růstová křivka *P. fontium* 24647 (LB médium, 30°C) před a po přidání různých objemů fonticinů. Fonticiny a etanol byly k rostoucím kulturám přidány v čase 210 min. Nejvyšší optická denzita (kontrolní kultury) v čase 500 min se rovnala 1,1.

Jak z grafu vyplývá, čím vyšší objemové procento fonticinů bylo k rostoucí kultuře přidáno, tím více je zpomalován růst citlivého kmene nebo dokonce dochází k úplné zástavě růstu. Tento výsledek byl tedy v souladu s pozorováním na inhibičních zónách. U nejnižšího přídatku fonticinů (zeleně) si lze všimnout, že kultura po krátkém zpomalení opět začíná růst exponenciálně s podobnou dobou zdvojení (T). Pravděpodobně došlo k navázání veškerých fonticinů na citlivé buňky, které uhynuly, ale ostatní buňky už ovlivněny nebyly.

5.2.1 Detekce hynutí citlivých buněk (Propidium iodide assay)

Detekce hynutí citlivých buněk byla provedena fluorescenčními pokusy s Propidium jodidem. Propidium jodid je fluorescenční molekula, která je schopná se vázat bez sekvenční preference mezi báze nukleových kyselin. Po navázání na nukleovou kyselinu se fluorescence propidia zvýší až 30x, fluorescenční excitační maximum se posune o 30 až 40 nm do červené oblasti a fluorescenční emisní maximum se posune o 15 nm do modré oblasti. Propidium jodid není schopen procházet membránami živých buněk, to znamená, že se na nukleovou

kyselinu může vázat až po narušení membrány. Tato metoda se proto využívá k detekci narušení buněčných membrán a hynutí buněk (Riccardi a Nicoletti 2006).

K bakteriální suspensi v kyvetě bylo přidáno 200 µl pufru jako kontrola do finálního objemu 2 ml – v grafu označeno jako *baseline*, dále byly k suspenzi přidávány fonticiny o objemu 0,5 %, 1 %, 2 %, 5 % a 10 % (v/v). Z grafu je patrné, že se zvyšujícím se objemem přidávaných fonticinů se zvyšuje i přírůstek intenzity fluorescence IF (Obr. 14). Oblasti dat v rozsahu 400 – 800 s byly proloženy přímkou lineární regrese a z těchto dat vznikl graf závislosti rychlosti vstupu PI do buněk (θ) jako funkce přidávaného objemu fonticinů (Obr. 15). Pokud by byl graf sigmoidní, dalo by se usuzovat, že působení fonticinů je kooperativní a že je potřeba více částic na zabití citlivé buňky. Abychom zjistili míru kooperativity fonticinů, graf jsme proložili Hillovou funkcí:

$$\theta = \frac{x^n}{(x^n + k^n) * max}$$

Rovnice 1

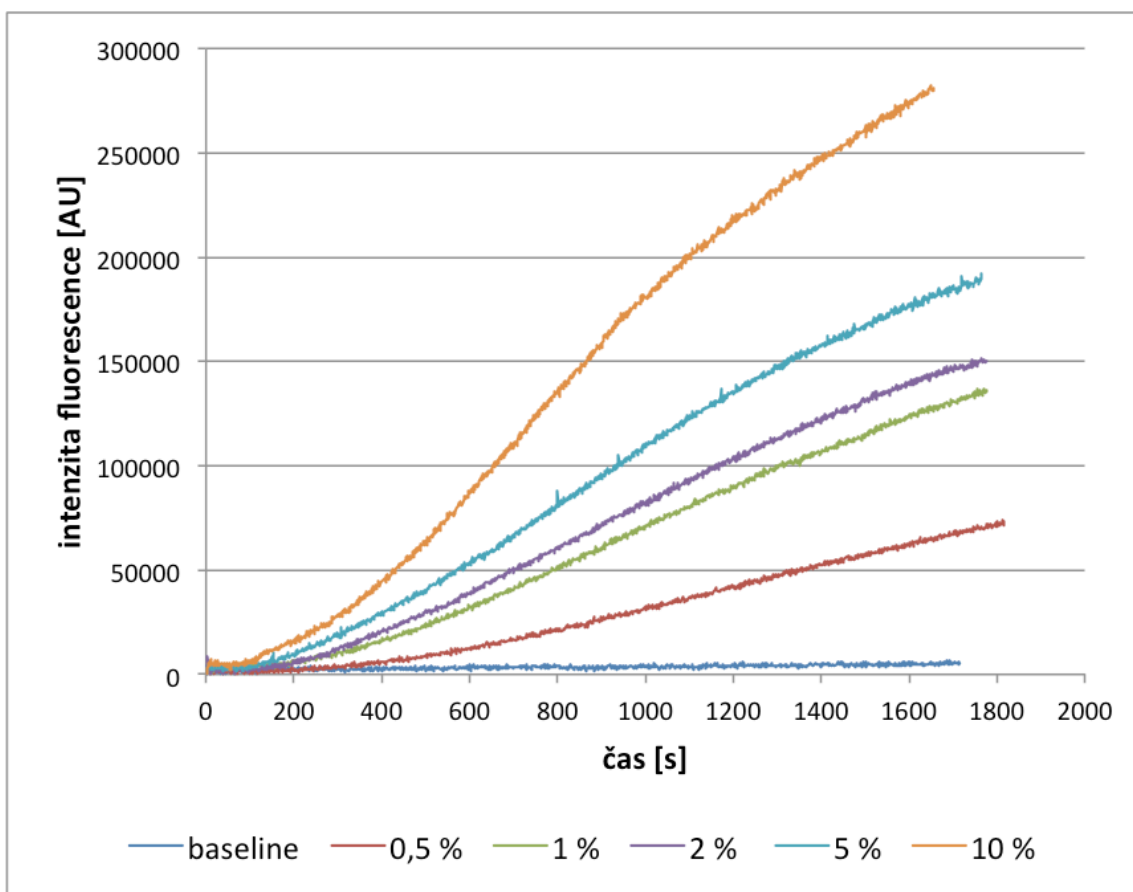
kde x je koncentrace ligandu, tedy fonticinů, k je přídavek fonticinů, při kterém uhyne polovina buněk, max je maximální hodnota efektu a n je Hillův koeficient. Hillův koeficient je například používán na odhadování počtu ligandů, které se musí navázat na receptor, aby byl komplex funkční (Weiss 1997).

Pro ověření získaných parametrů jsme kinetiky vstupu propidia do buněk (Obr. 15) proložili následující funkcí:

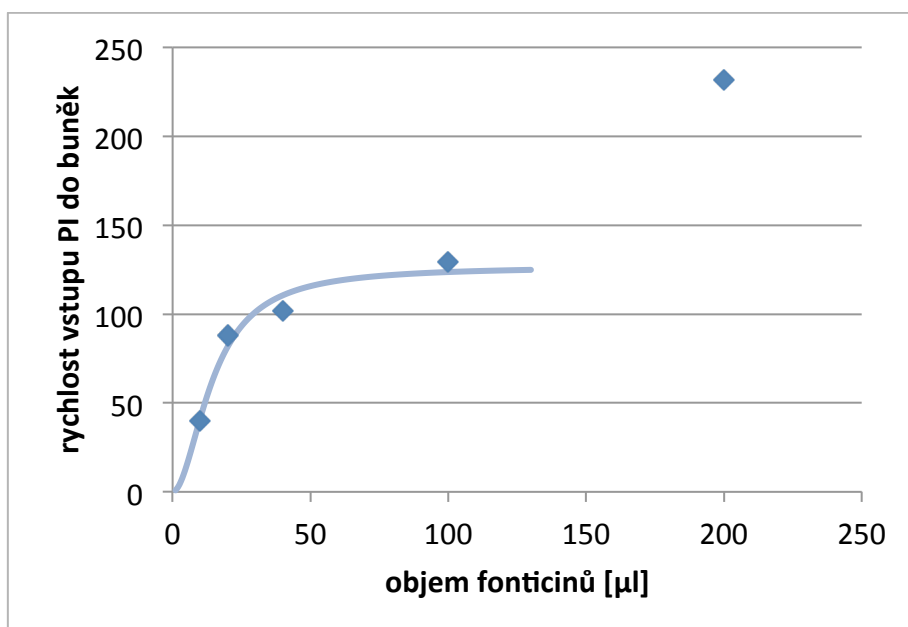
$$IF = max(1 - \exp(-x/\tau))^n$$

Rovnice 2

kde x je čas, τ je časová konstanta za kterou uhyne průměrná buňka, max je maximální hodnota efektu a n je parametr, který přibližně odpovídá stechiometrii molekulárních komplexů, které se podílejí na daném procesu. Hodnoty $n = 1$ odpovídají jednoduchému exponenciálnímu růstu, v případě, že jsou hodnoty pro n vyšší než jedna, můžeme očekávat, že pro správné fungování bude potřeba více proteinových komplexů (Gray *et al.* 1998). Parametry zjištěných hodnot pro všechny měřené koncentrace fonticinů jsou shrnuty v tabulce (Tab. 2).



Obr. 14: Koncentrační závislost působení fonticinů na citlivé buňky.



Obr. 15: Závislost rychlosti vstupu PI do buněk jako funkce přidaného objemu fonticinů. Data jsou proložena Hillovou funkcí. Odlehlý bod nebyl zahrnut. Parametry rovnice: $k = 14,65$ $\max = 126,83$ $n = 1,9$.

Tab. 2: Parametry získané proložením dat Hillovou funkcí.

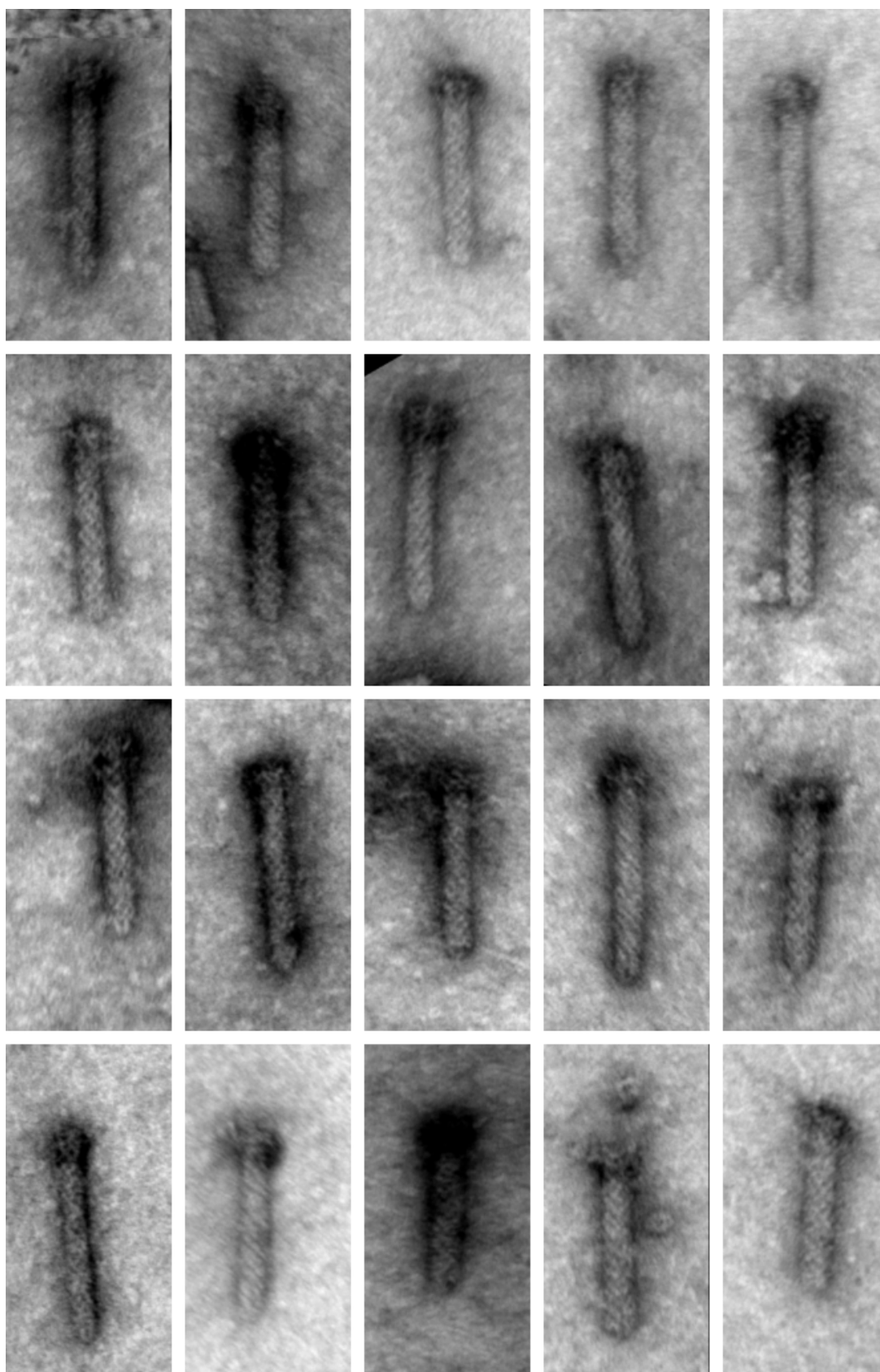
Koncentrace fonticinů	0,50%	1%	2%	5%	10%
τ	2069	1650	991	913	732
max	226767	302030	227660	267864	365477
n	2,08	1,86	2,26	2,08	2,52

Ze získaných výsledků vyplývá, že baktericidní účinnost fonticinů se úměrně zvyšuje s jejich koncentrací. Hillův koeficient pro všechny koncentrace fonticinů se pohyboval blízko dvou, což znamená, že pro usmrcení bakteriální buňky patrně nestačí pouze jeden fonticinový komplex. Je tedy potřeba, aby se na receptory bakteriálních vnějších membrán vázaly nejméně dva komplexy. Množství fonticinů, potřebných pro inhibici bakteriální buňky bychom mohli získat z přímého pozorování fonticinů vázaných na povrchu buněk.

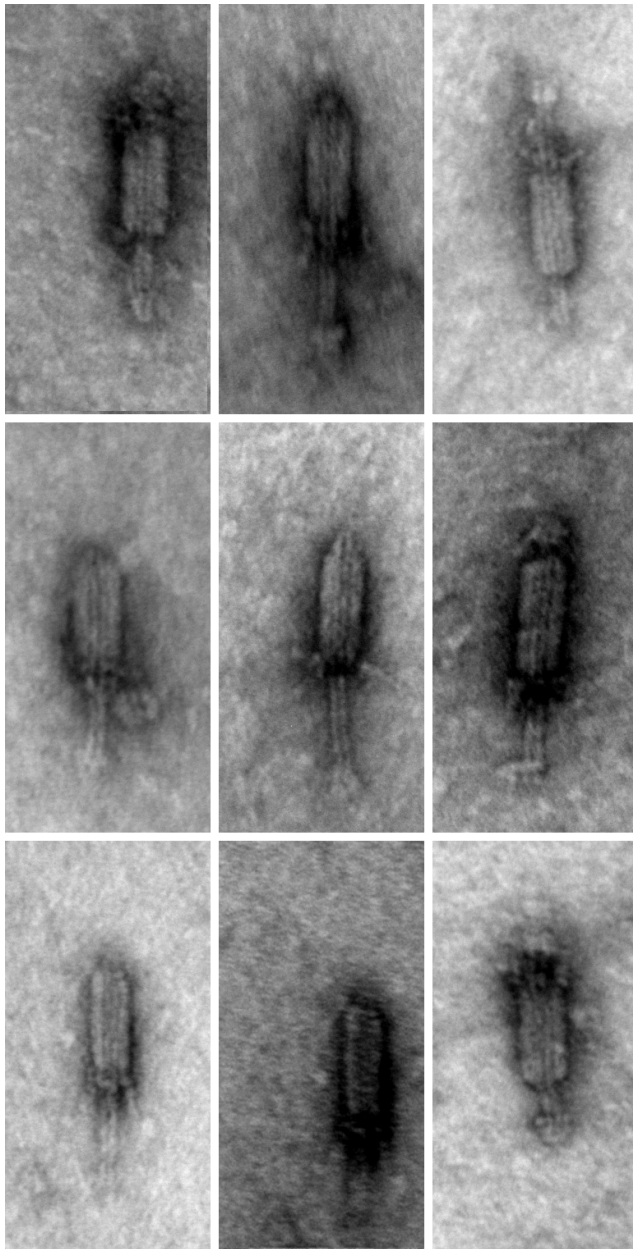
5.3 Struktura fonticinů

Strukturu fonticinových partikulí jsme ověřovali pomocí transmisní elektronové mikroskopie. Fonticiny byly indukovány mitomycinem C po 14 h ve 20°C při 160 rpm, následně stáčený, filtrován a negativně barvený molybdenanem amonným a uranyl acetátem. TEM byla prováděna v Laboratoři elektronové mikroskopie, PřF UK s pomocí RNDr. Miroslava Hyliše, Ph.D. na mikroskopu JEOL JEM-1011.

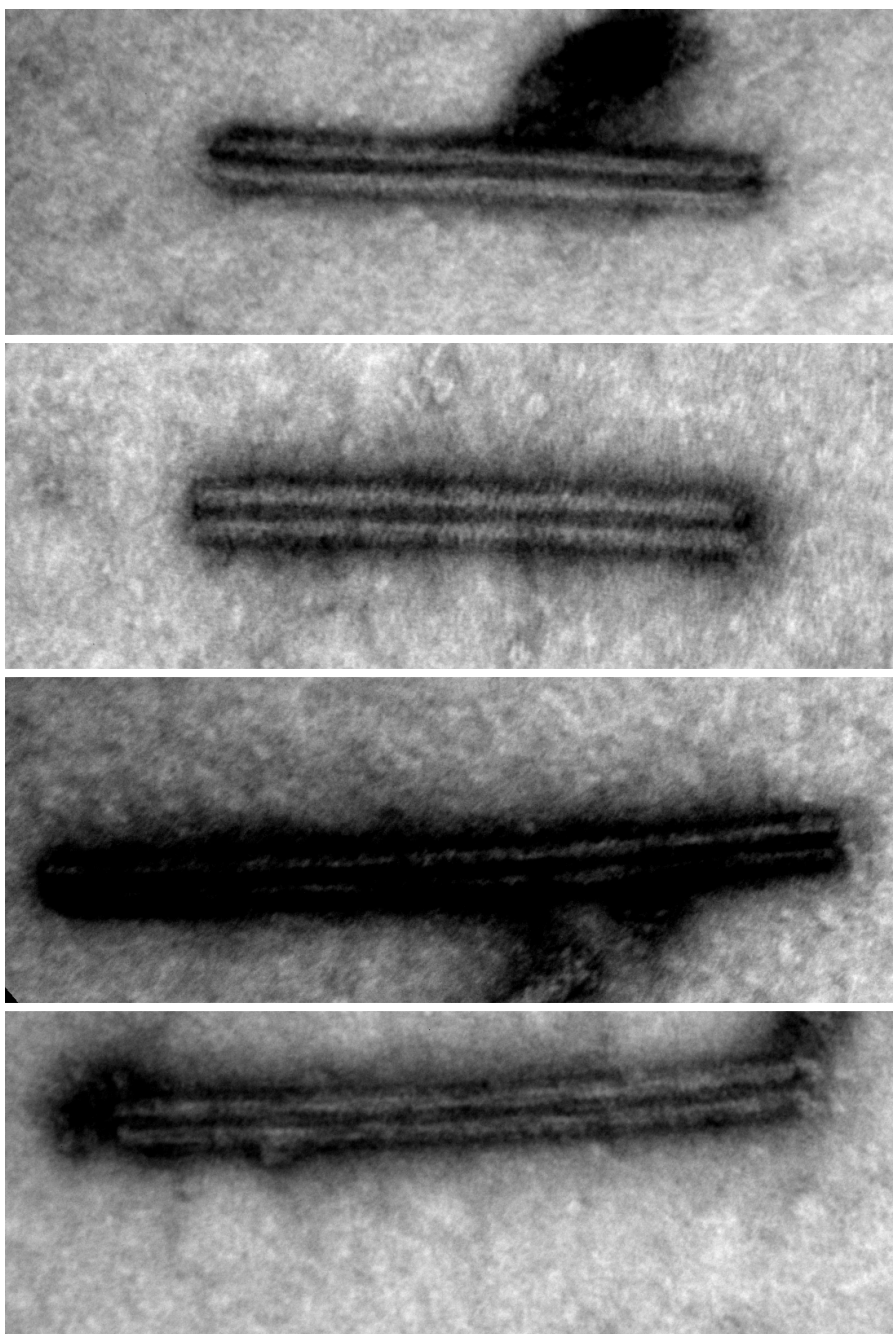
Kultivační médium obsahovalo fágům podobné partikule v několika různých konformacích. Nejvíce zastoupené kontraktilní částice (66 %) se v médiu vyskytují většinou ve své nativní, nekontrahované podobě (Obr. 16). Kontrahované fonticiny se v médiu vyskytují pravidelně, ale v mnohem menší míře, tvoří přibližně 20 % všech produkovaných částic (Obr. 17). Kromě fonticinů kontraktilního typu jsme se setkali také s různými artefakty, které pravděpodobně nejsou schopny penetrovat bakteriální membrány. Jedná se o komplexy tvořené několika podjednotkami kontrahovaných fonticinových pouzder (Obr. 18). Tyto komplexy svojí délkou několikanásobně převyšují kontraktilní fonticiny a v médiu jich je přibližně 7 %. Ve stejném množství se v médiu vyskytují také flexibilní, nekontrahovatelné fonticiny (Obr. 19).



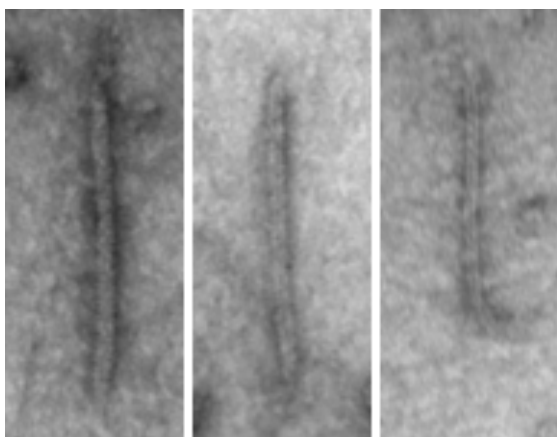
Obr. 16: Přehled kontraktilních fonticinů v nativní konformaci – snímky z transmisního elektronového mikroskopu. V této konformaci jsou fonticiny s absolutní převahou produkovány do média. Fonticiny mají uniformní morfologii, na délku dosahují částice průměrně 115 nm. Výška každého snímku je 200 nm.



Obr. 17: Kontraktilní fonticiny v kontrahované podobě. Na obrázku je vidět pravidelně se opakující struktura, kde kontrahované pouzdro odhaluje jádro fonticinu, které po navázání fonticinu (v nativní konformaci) na receptor citlivých buněk prochází buněčnou membránou a vytváří velké póry. Výška každého snímku je 200 nm.



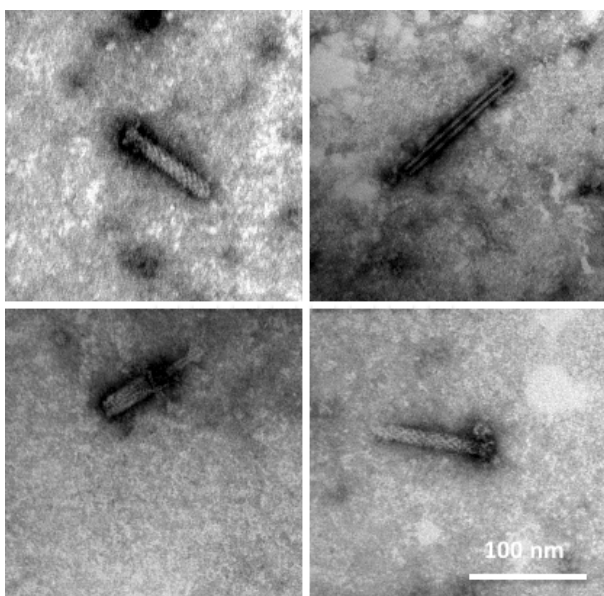
Obr. 18: Komplexy tvořené několika podjednotkami kontrahovaných fonticinových pouzder. Kontrahované pouzdro měří průměrně 60 nm (viz Obr. 17). Na prvních dvou obrázcích jsou tedy pravděpodobně tetramery; tyto částice měří 240 nm. Na spodních dvou obrázcích jsou vidět pravděpodobně hexamery; tyto částice měří 350 nm. Délka každého snímku je 400 nm.



Obr. 19: Flexibilní, nekontrahovatelné fonticiny. Výška každého snímku je 200 nm.

5.3.1 Produkce fonticinů indukovaná UV zářením

Fonticiny indukované UV zářením po dobu 15 s, 30 s, 60 s ani 120 s neprokazovaly žádnou baktericidní aktivitu proti citlivému kmeni. Přítomnost fonticinů ve vzorcích jsme se rozhodli ověřit na elektronovém mikroskopu. Zjistili jsme, že fonticinové partikule jsou do média produkovány i při indukci UV zářením (Obr. 20), ale pouze v malé míře. Částic bylo na snímcích vidět asi 20x méně, než při jiném způsobu indukce. Není tedy zcela jasné, jestli se jedná o spontánní produkci, nebo zda došlo k indukci. Aby byla indukce UV zářením účinná, bylo by pravděpodobně nutné ozařovat kulturu v pravidelných intervalech během kultivace. V takovém případě by se ale zvýšila pravděpodobnost, že bude docházet k hynutí buněk.



Obr. 20: Indukce fonticinů pomocí UV záření (60 s).

5.4 Černé lipidické membrány

Pórotvornou aktivitu fonticinů jsme testovali *in vitro* na černých lipidických membránách. Cílem těchto pokusů byla charakterizace pórotvorných vlastností fonticinů, určení experimentálních podmínek, ve kterých je fonticinová aktivita nejvyšší a použití fonticinů jako nanozařízení na charakterizaci makromolekul a nanočástic.

5.4.1 Experimentální podmínky pro měření s fonticiny na BLM

První pokusy probíhaly s použitím purifikovaných vzorků, které jsme získali z brněnské laboratoře (Laboratoř bakteriální genetiky a genomiky, LF MU). Měření probíhalo nejprve na membránách ze sójových lipidů (Azolektin 1114, Fluka). Fonticinové částice postupem času degradovaly a do membrán se zabudovávaly neochotně. I z těchto důvodů jsme se rozhodli pro vlastní produkci fonticinů, jak již bylo zmíněno výše. Fonticiny produkované po indukci mitomycinem C však ztrácely na černých lipidických membránách aktivitu, po týdnu skladování ve 4°C klesla aktivita fonticinů asi o polovinu, takže bylo nutné vymyslet lepší uskladnění. Nakonec jsme začali uskladňovat fonticiny v -80°C a před každým použitím jsme je sonikovali 30x1s na ledu. Takto uskladněné fonticiny byly aktivní na živých buňkách i několik týdnů od produkce, ale *in vitro* byla aktivita příliš nízká, což se projevovalo nízkým počtem událostí na membráně.

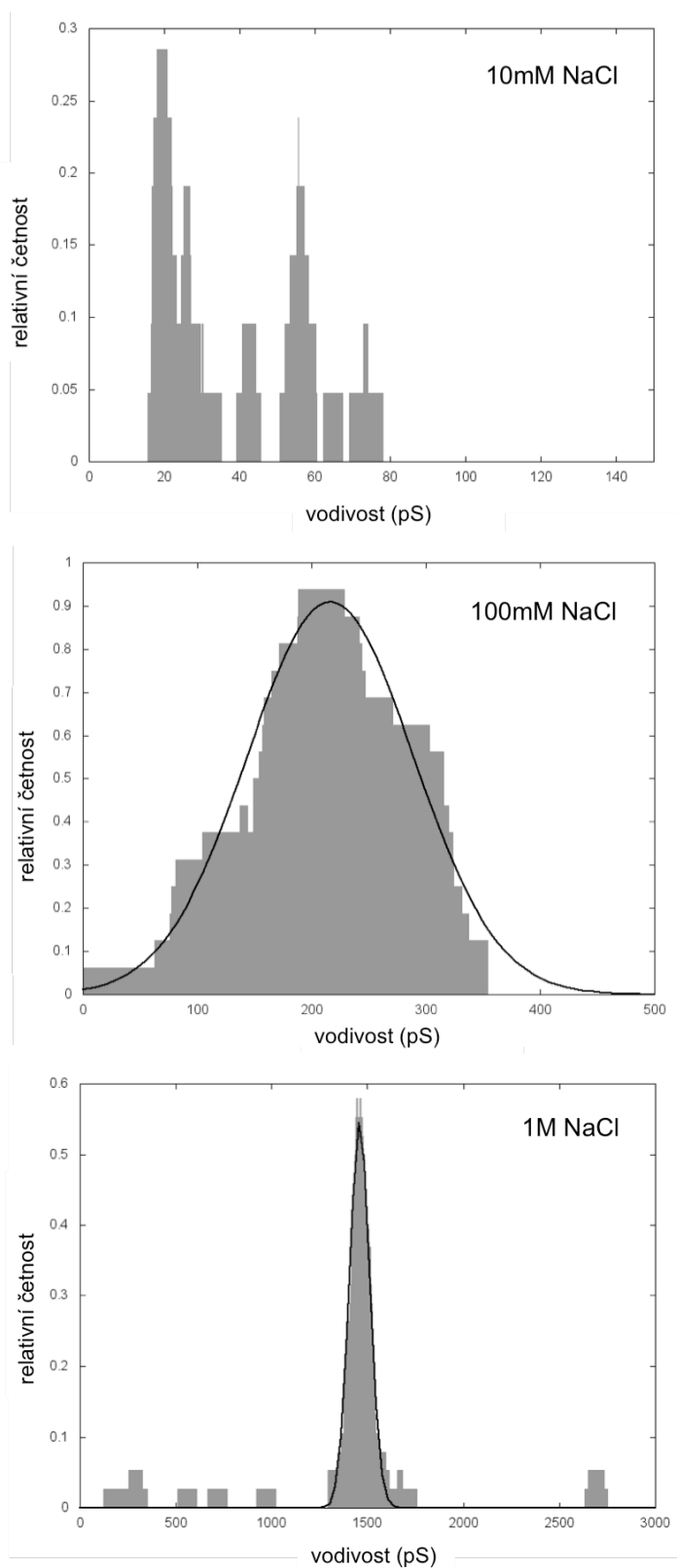
Neochotu fonticinů vázat se na sójové lipidy jsme přisuzovali absenci membránových lipopolysacharidů, které by mohly sloužit jako receptory. Z těchto důvodů jsme se rozhodli izolovat lipidy z citlivého kmene *P. fontium* 24647 a *Y. enterocolitica* Y551. Lipidový izolát totiž obsahuje kromě fosfolipidů také část lipopolysacharidů. Izolované lipidy z těchto dvou bakteriálních kmenů jsme rozpustili podle standardního protokolu v dekanu s butanolem (9:1 v/v) a měřili na černých lipidických membránách za běžných podmínek (1M NaCl, 8mM MgCl₂, 5mM Tris, pH 7,3). Izolované lipidy tvořily nestabilní membrány, které často praskaly. Na takových membránách bylo nemožné detekovat fonticinovou aktivitu. Pro lepší stabilitu membrán jsme 10 % izolovaných lipidů smíchali s 90 % fosfolipidového extraktu z *E. coli* (Avanti Polar Lipids). Fosfolipidová směs už tvořila stabilnější membrány, přesto se nakonec ukázalo, že se fonticiny váží i do membrán složených pouze z 3% směsi fosfolipidového extraktu z *E. coli* v dekanu s butanolem. Tento membránový systém byl ze všech nejstabilnější a od té doby jediný používaný.

Fonticiny jsou, podobně jako některé bakteriofágy, stabilní pouze v médiu s obsahem hořčnatých iontů (Adams 1949). Proto byl ke všem pokusům přidáván do pufru roztok MgCl₂ do finální koncentrace 8 mM.

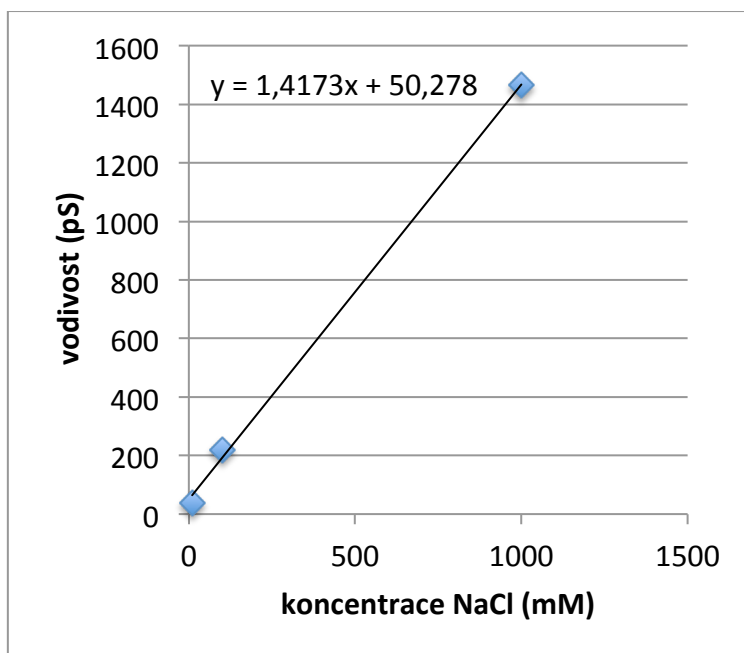
5.4.2 Závislost vodivosti fonticinů na koncentraci elektrolytu

Vodivost fonticinových kanálů byla měřena v 10mM, 100mM a 1M roztoku NaCl s přidaným MgCl_2 do koncentrace 8 mM. Hodnoty vodivosti jednotlivých pórů byly vyneseny do histogramů (Obr. 21). Histogramy byly vytvořeny metodou jádrového odhadu (*Kernel Density Estimation*) a proloženy Gaussovou křivkou. U dat, kde nebylo možné proložení Gaussovou křivkou, byl vypočítán vodivostní průměr.

Ze středních hodnot vodivostí byl vytvořen graf závislosti vodivostí fonticinů na koncentraci elektrolytu (Obr. 22). Tento graf byl proložen přímkou. Z grafu plyne že závislost vodivosti fonticinových kanálů na koncentraci NaCl je téměř lineární. To znamená, že fonticinový kanál je tak velký, že ionty jím procházejí neomezeně, nedochází k saturaci kanálu a patrně ani k vazbě iontů na jeho stěny. Přímka v grafu nevychází z nuly, protože množství iontů je ovlivněno přítomností dvojmocných iontů hořčíku, které mohou vodivost ovlivňovat dvojnásobně než jednomocné ionty sodíku a chlóru.



Obr. 21: Histogramy vodivostních stavů fonticinů v roztoku 8mM MgCl_2 , 5mM Tris, pH 7,3 a NaCl rozdílné koncentrace (viz popis v grafech). Na prvním obrázku je histogram fonticinových kanálů v 10mM roztoku NaCl, průměrná hodnota vodivosti jednoho kanálu je 39 pS. Na dalším obrázku je histogram vodivostí fonticinů ve 100mM NaCl, střední hodnota vodivosti je 220 pS (střed Gaussovy křivky). Na posledním obrázku je histogram vodivostí fonticinů v 1M NaCl, střední hodnota vodivosti odpovídá 1465 pS (střed Gaussovy křivky).



Obr. 22: Závislost středních hodnot vodivostí na koncentraci elektrolytu. Rovnice proložené přímkou: $y = 1,4173x + 50,278$. Z rovnice získáme hodnotu „specifické vodivosti“: 1,4 pS*l/mM. Z této hodnoty lze vypočítat, jakou vodivost bude mít fonticin v libovolné koncentraci NaCl.

5.4.3 Rozměry fonticinového póru

Pórotvornou aktivitu fonticinů jsme ověřili na černých lipidických membránách. Abychom mohli charakterizovat vlastnosti různých makromolekul pomocí fonticinového nanopóru, bylo nutné znát rozměry tohoto póru.

Standardně se měření velikosti pórů neznámé velikosti provádí tak, že se pór blokuje neelektrolyty s různě velkými molekulami. Velmi často se používají odlišné velikosti polyethylenglykolu. Pokud známe vodivost kanálu a poloměr molekul neelektrolytů, můžeme sledovat, jak molekuly neelektrolytů ovlivňují vodivost kanálu v závislosti na jejich velikosti (Krasilnikov *et al.* 1995). Tento postup byl však pro určení velikosti fonticinů nevhodný, protože fonticiny tvoří tak velké kanály, že nebylo možné detekovat přítomnost malých molekul polyethylenglykolu a velké molekuly polyethylenglykolu blokovaly fonticinové kanály jen z části. Blokace způsobené malými molekulami polyethylenglykolu by bylo možné vidět pouze při velmi vysoké koncentraci, například 20 % (v/v). V takové koncentraci by ale nejspíš fonticiny ztratily aktivitu. Proto jsme museli přistoupit k jednoduššímu postupu.

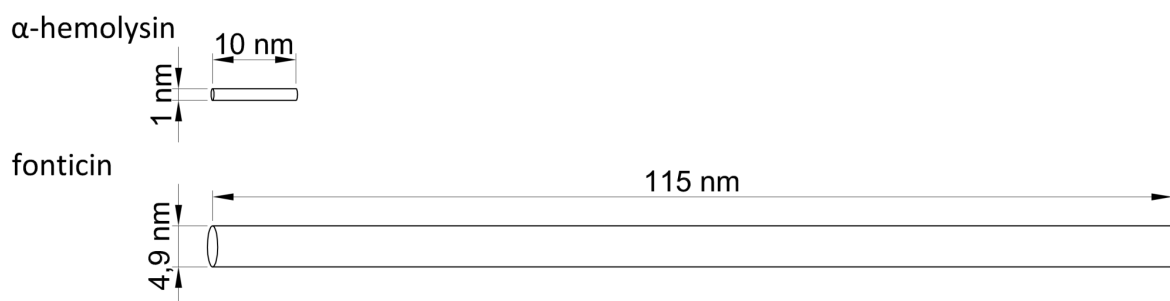
Ze znalosti vodivosti (G) jednotlivých kanálů, která odpovídá 1,4 nS v 1M NaCl, jsme spočítali efektivní vnitřní průměr fonticinového kanálu. Jedná se o jednoduchý výpočet vodiče válcovitého tvaru podle vzorce:

$$G = \frac{S}{(\rho * l)}$$

kde l je délka vodiče; $l = 115$ nm (údaj z TEM, viz Obr. 16), S je průřez vodiče (který hledáme); χ je konduktivita; $\chi = 85$ mS/cm (NaCl v roztoku¹), ρ je měrný elektrický odpor; $\rho = 117647$ $\mu\Omega\text{m}$ (vypočítáno z χ), vše počítáno pro Na^+ a Cl^- ionty. Dosazením do vzorce nám vyšlo, že $S = 18,9$ nm². Z této hodnoty byl pak vypočítán efektivní vnitřní průměr d_{ef} .

Efektivní vnitřní průměr fonticinového kanálu: $d_{\text{ef}} = 4,9$ nm. Skutečná hodnota měrného elektrického odporu NaCl (ρ) je ve fonticinovém kanálu nejspíš o trochu větší, než v běžném roztoku. Z čehož plyne, že efektivní vnitřní průměr póru bude pravděpodobně také větší, než ten, který vyšel. Z toho důvodu je vhodnější zapsat výsledek: $d_{\text{ef}} \geq 4,9$ nm.

Pro porovnání jsme vypočítali i efektivní vnitřní průměr α -hemolysinového kanálu ($G = 0,7$ nS v 1M NaCl), kdy $d_{\text{ef}} \geq 1,0$ nm (Obr. 23). Z krystalografické struktury α -hemolysinového kanálu je známo, že vnitřní průměr kanálu se pohybuje v rozmezí 1,4 nm až 4,6 nm, to znamená, že se náš výpočet příliš neliší od nejmenšího průměru. Z těchto údajů každopádně plyne, že fonticinový kanál má přibližně 24x větší efektivní průřez než α -hemolysin.



Obr. 23: Porovnání zdánlivých rozměrů pórotvorných proteinových komplexů. Na obrázku je α -hemolysin, jehož průměr odpovídá hodnotě vypočítané z vodivosti póru, délka vychází z krystalové struktury. Délka fonticinu je změřena pomocí TEM, průměr odpovídá hodnotě vypočítané z vodivosti póru.

¹<http://www.ionode.com/theory/conductivity-theory>

5.4.4 Charakterizace a analýza molekul procházejících nanopórem

Nanopóry tvořené α -hemolysinem jsou akorát tak velké, že se dají velmi dobře blokovat jednovláknovou DNA. Této vlastnosti se využívá například v nanopórovém sekvenování. Fonticiny tvoří v membránách velké transmembránové póry. Narozdíl od α -hemolysinu by dvouvláknová DNA, jejíž průměr se pohybuje kolem 2 nm, měla snadno projít fonticinovým kanálem. Naším cílem bylo použít fonticinové nanopóry jako nanozařízení na charakterizaci dvouvláknové DNA a dalších makromolekul a nanočástic. Seznam testovaných látek a částic je uveden v následující tabulce (Tab. 3).

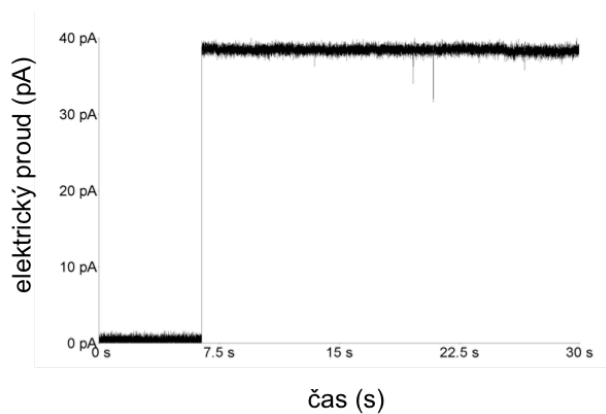
Tab. 3: Látky testované na černých lipidických membránách.

	Molární hmotnost (kDa)	Průměrná velikost (nm)	Délka (nm)
BSA	66	4	14
ssDNA	3 037	1,4	3400
dsDNA	6 075	2	3400
DNP	0,012 – 0,6	5 – 50	5 – 50
PEG 8000	8	3	3

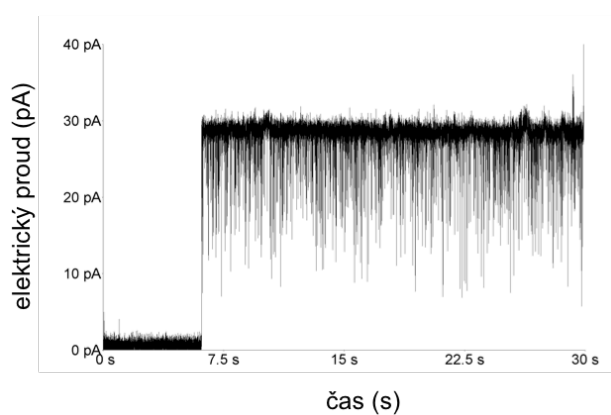
BSA je protein tak velký, že by měl procházet fonticinovým kanálem a z velké části jej blokovat. Délka DNA byla vypočítána z délky jednoho nukleotidu: 0,34 nm a vynásobena počtem párů bazí plazmidu (10 kbp). Diamantové nanočástice jsou velké 5 nm, ale v roztoku dochází k tomu, že tvoří agregáty, které dosahují velikosti až 50 nm. Tak velké agregáty nejsou schopné blokovat fonticinový kanál.

5.4.5 Blokace α -hemolysinu

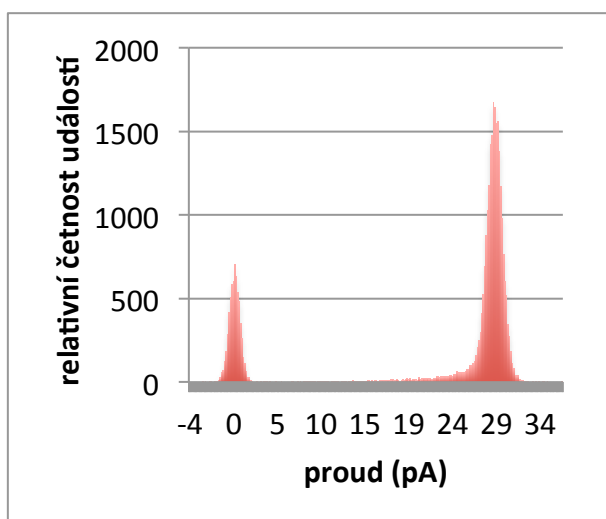
Abychom mohli pozorovat a pochopit chování fonticinových kanálů během blokace, využili jsem dobrou znalost kontrolních nanopórů. Jako kontrolní molekula byl použit α -hemolysin, který na černých lipidických membránách tvoří stabilní, dobře definované póry (Obr. 24), které jsou snadno blokovatelné širokou škálou velikostí molekul polyethylenglykolu. Měření probíhalo v 1M NaCl, 8mM MgCl₂, 5mM Tris, pH 7,3 při aplikovaném napětí 50 mV. Do kyvety byl α -hemolysin přidáván na stranu cis v koncentraci 0,25 μ g/ml. Kanály byly blokovány monodisperzním polyethylenglykolem 1251,5, který byl přidáván na stranu trans v koncentraci 0,5 mg/ml. Polyethylenglykol způsoboval na otevřeném kanálu zřetelné blokace (Obr. 25). Četnost a hloubka blokáží byly vyneseny v histogramu (Obr. 26).



Obr. 24: Otevřený, neblokovaný α -hemolysinový kanál.



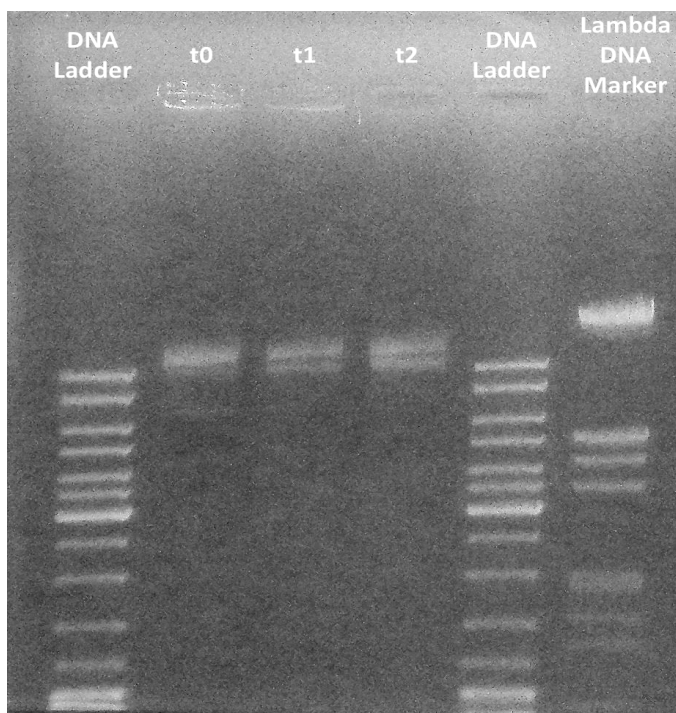
Obr. 25: Otevřený α -hemolysinový kanál blokováný polyethylenglykolem ($M_w = 1251,5$ g/mol).



Obr. 26: Histogram iontových proudů α -hemolysinu blokováného polyethylenglykolem ($M_w = 1251,5$ g/mol). První vrcholek značí bazální proud, druhý vrcholek znázorňuje jeden otevřený kanál, který je obklopen blokacemi různých hloubek.

5.4.6 Blokace fonticinových kanálů DNA

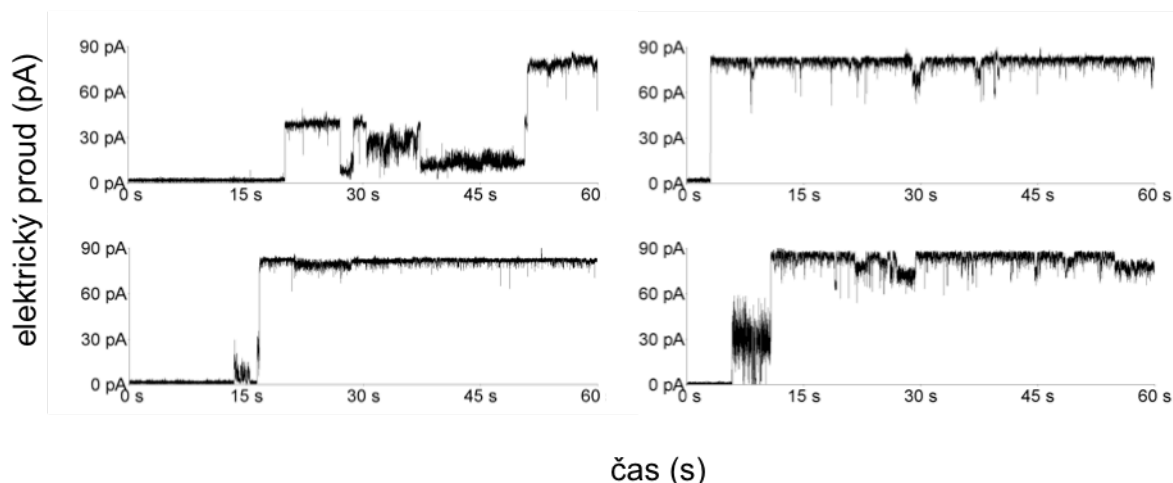
Naším záměrem bylo využít velkých rozměrů fonticinových nanopórů na detekci a charakterizaci zejména dvouvláknové DNA, která by měla díky svým rozměrům procházet fonticinovým nanopórem velmi snadno. Na blokaci fonticinových kanálů jsme používali izolovanou plazmidovou DNA (plazmid pDG1661), která byla pro naše použití linearizována restričním enzymem EcoRI (Obr. 27). Měření na černých lipidických membránách s fonticiny probíhalo vždy v měřicím pufru, který obsahoval 1M NaCl, 8mM MgCl₂, 5mM Tris při pH 7,3.



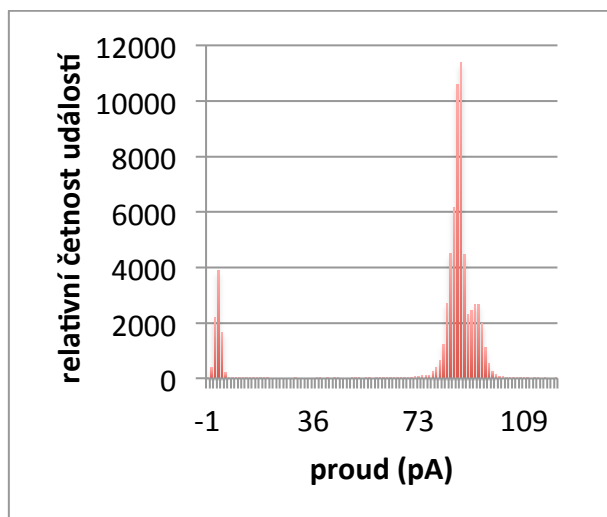
Obr. 27: Agarová elektroforéza linearizované dsDNA. Vlevo na gelu je standard molekulových hmotností DNA – *DNA Ladder*, podle kterého byla identifikována lineární plazmidová DNA o velikosti 10 000 bp (první viditelný proužek standardu). Za stejným účelem byl na gel nanesen i *Lambda DNA Marker*. Plazmidová cDNA byla štěpena restričním enzymem EcoRI. Čas t_0 je začátek restrikce, takže cDNA není štěpená, v čase t_1 je vidět částečně štěpená DNA po 18 h štěpení. Čas t_2 značí štěpení po 25 h, kde je již vidět, že značná část cDNA je linearizovaná. Linearizovanou dsDNA jsme používali na blokaci fonticinových kanálů v její dvouvláknové podobě, nebo v denaturované podobě jako jednovláknovou.

5.4.6.1 *Blokace fonticinových kanálů dvouvláknovou DNA*

Fonticinové kanály byly blokovány izolovanou plazmidovou DNA (plazmid pDG1661), která byla štěpena restrikcí enzymem EcoRI. Fonticiny byly přidávány na stranu cis teflonové kyvety v koncentraci 6,6 % (v/v). Linearizovaná DNA o délce 10 000 bp byla přidávána na trans stranu v koncentraci 1,5 % (v/v). Navzdory očekávání byly poklesy iontového proudu způsobené dvouvláknovou DNA relativně mělké a celkově nehomogenní (Obr. 28), což ukazuje i histogram jednotlivých blokací (Obr. 29).



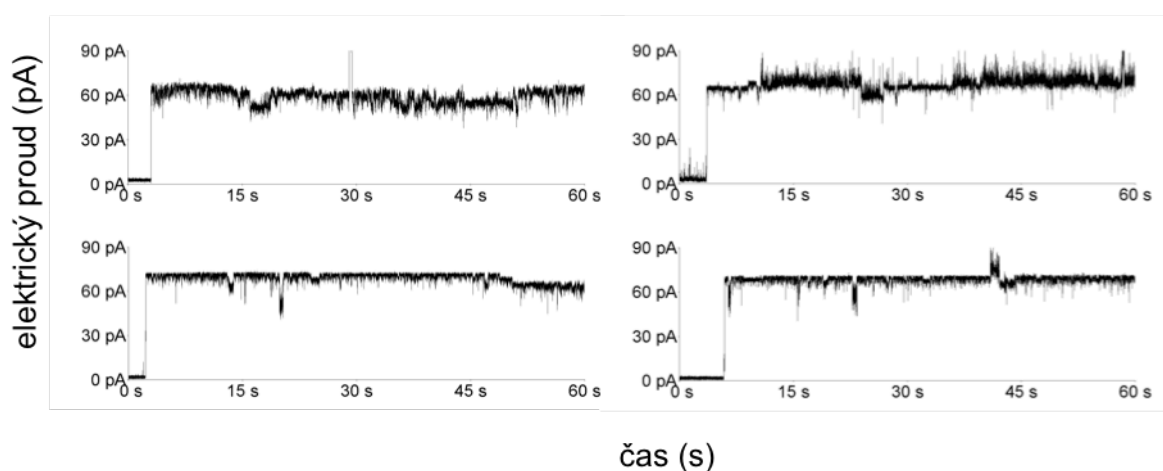
Obr. 28: Blokace čtyř různých fonticinových kanálů dsDNA.



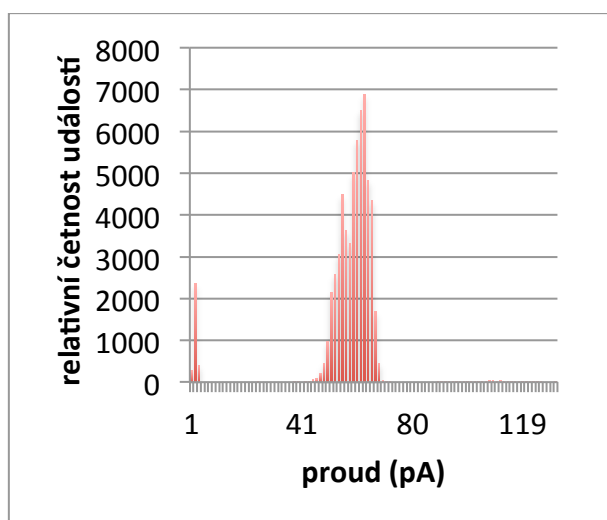
Obr. 29: Histogram blokací otevřeného fonticinového nanopóru molekulami dsDNA. Blokace způsobené dsDNA jsou mělké a nepříliš zřetelné.

5.4.6.2 *Blokace fonticinových kanálů jednovláknovou DNA*

Fonticinové kanály byly dále pokusně blokovány také jednovláknovou DNA. Byla použita štěpená plazmidová DNA v restrikčním místě pro EcoRI, která byla před použitím denaturována teplem při 90°C po dobu 5 min. DNA byla přidávána na stranu trans teflonové kyvety v koncentraci 1,5 % (v/v), fonticiny byly přidávány na stranu cis v koncentraci 6,6 % (v/v). Blokace způsobené ssDNA (Obr. 30) byly velmi mělké s relativně nízkou četností (Obr. 31). Neschopnost ssDNA blokovat zřetelně fonticinové kanály může být způsobena malým průměrem jednovláknové DNA vzhledem k velikosti nanopóru a také opětovnou renaturací jednotlivých vláken do nedefinovatelných tvarů různé velikosti.



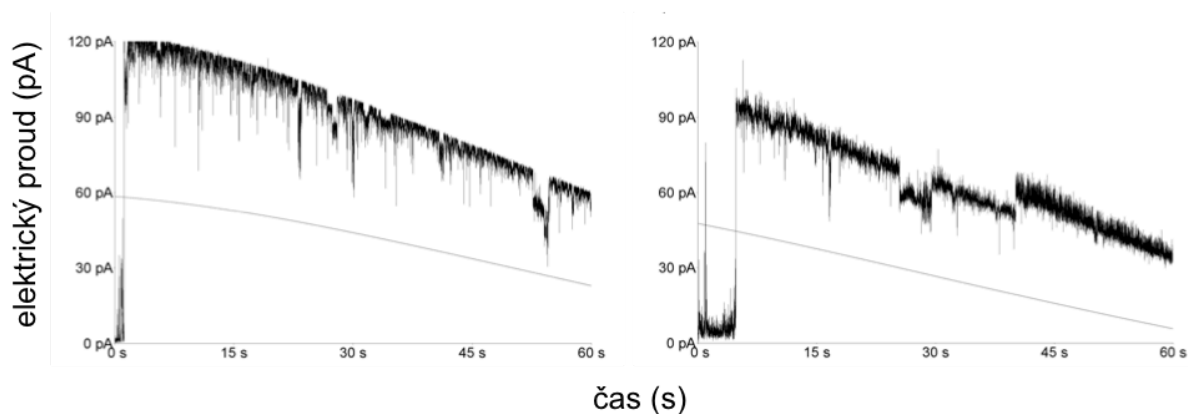
Obr. 30: Fonticiny blokované ssDNA.



Obr. 31: Histogram blokad otevřeného fonticinového nanopóru. První vrcholek grafu značí bazální proud, druhý značí otevřený kanál. Blokace jsou vidět v okolí otevřeného kanálu, což znamená, že blokace nejsou příliš hluboké.

5.4.6.3 Napěťová závislost fonticinů blokových ssDNA

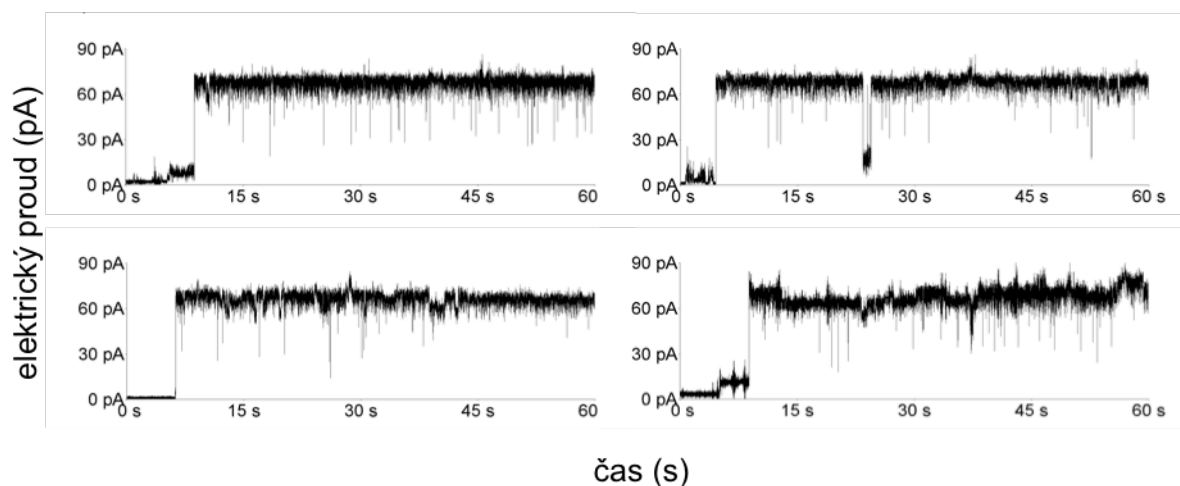
Blokace fonticinů jednovláknovou DNA nebyly příliš četné ani hluboké. Z toho důvodu jsme se rozhodli testovat závislost četnosti blokací na aplikovaném potenciálu. Pro tyto účely byly použity napěťové kmity o rozsahu 60 – 10 mV (Obr. 32). Snížení napětí ze 60 mV až na 10 mV trvalo 90 s. Tyto napěťové cykly se opakovaly v pravidelných 90s intervalech.



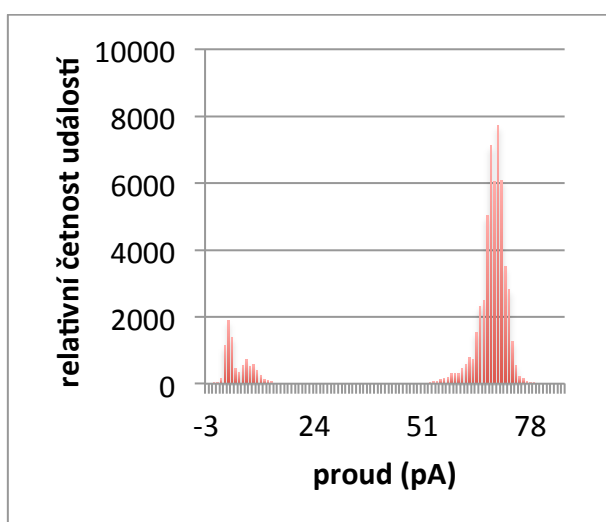
Obr. 32: Fonticiny blokové ssDNA při kolísavém napětí v rozsahu 60 – 10 mV. Klesající čára na obou obrázcích značí průběh aktuálního napětí na membráně.

5.4.7 Blokace fonticinových kanálů nanodiamanty

Dále byly fonticinové kanály blokovány také částicemi nanodiamantů. Tyto částice jsou v ideálním případě, kdy nedochází k jejich agregaci, velké 5 nm. Jsou to tak velké částice, že by měla být jediná molekula schopná zablokovat fonticinový kanál až na úroveň bazálního proudu. Před každým měřením byly nanodiamantové částice sonikovány 30 min ve vodní lázni při 25°C tak, aby došlo k rozpadnutí agregátů. Nanodiamanty byly přidávány na stranu trans teflonové kyvety v koncentraci 100 µg/ml. Otevřené fonticinové kanály byly nanodiamanty blokovány (Obr. 33), ale nedocházelo k blokacím až na bazální úroveň proudu. Iontový proud byl blokován přibližně do poloviny velikosti kanálu, jednotlivé blokace byly vyneseny v histogramu (Obr. 34). Velmi často také docházelo k interakci nanodiamantových částic s membránovými fosfolipidy, což se na záznamu projevovalo jako zvýšený šum membrány a také sníženou schopností fonticinů tvořit do membrány póry.



Obr. 33: Fonticinový kanál blokováný částicemi nanodiamantů.

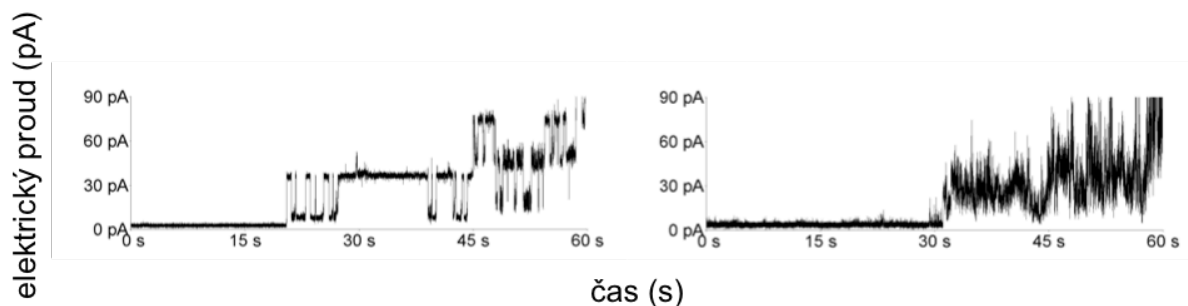


Obr. 34: Histogram proudových blokáží fonticinového kanálu způsobených částicemi nanodiamantů.

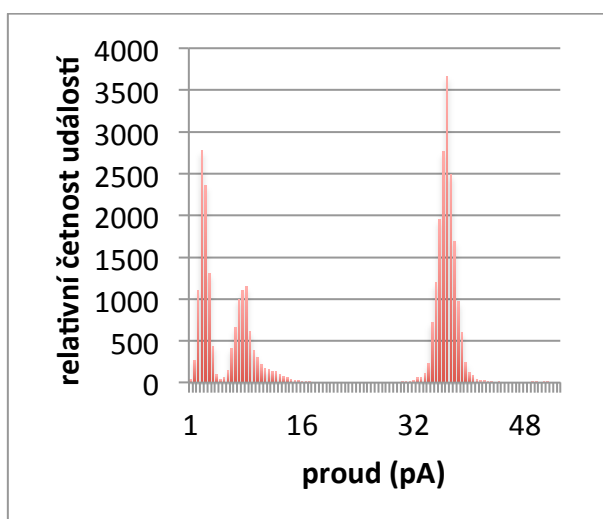
5.4.8 Blokace fonticinových kanálů BSA

Pórtvorné proteiny se využívají také na charakterizaci proteinových molekul. V našem případě byly fonticinové kanály blokovány hovězím sérovým albuminem (BSA). Přestože by BSA mělo být akorát tak velké, aby blokovalo fonticinové kanály v nativní konformaci, tak k blokacím nedocházelo. Proto jsme při měření protein denaturovali močovinou. BSA bylo přidáváno na stranu trans v koncentraci 0,5 mg/ml spolu s 1M močovinou. Denaturované BSA vytvářelo dlouhotrvající, hluboké blokace iontového proudu otevřeného fonticinového kanálu (Obr. 35). Distribuce událostí na otevřeném fonticinovém póru je znázorněna pomocí histogramu (Obr. 36). Močovina, přidávána k BSA, zvyšovala

viskozitu měřicího pufru, což znesnadňovalo vytváření membrán. Přítomnost močoviny se někdy také projevovala vznikem nestabilních vodivostních stavů otevřeného fonticinového kanálu.



Obr. 35: Fonticinové kanály blokováné částečně denaturovaným BSA. Zvláštní vodivostní stavy na obrázku vpravo jsou pravděpodobně způsobeny interakcí přidané močoviny s otevřeným fonticinovým kanálem.

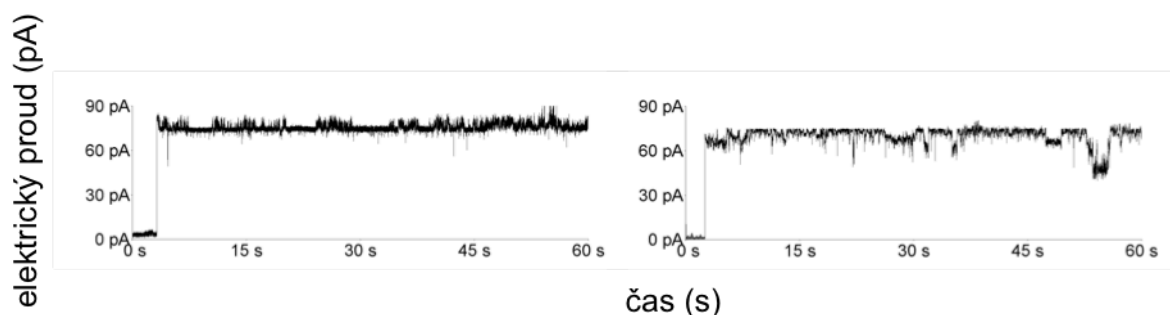


Obr. 36: Histogram blokáží otevřeného fonticinového kanálu, blokováného částečně denaturovaným BSA. První vrcholek grafu značí bazální proud, druhý vrcholek znázorňuje hladinu proudu blokáží a třetí vrcholek v grafu značí otevřený fonticinový kanál. Blokáce způsobené BSA jsou hluboké a dobře rozlišitelné.

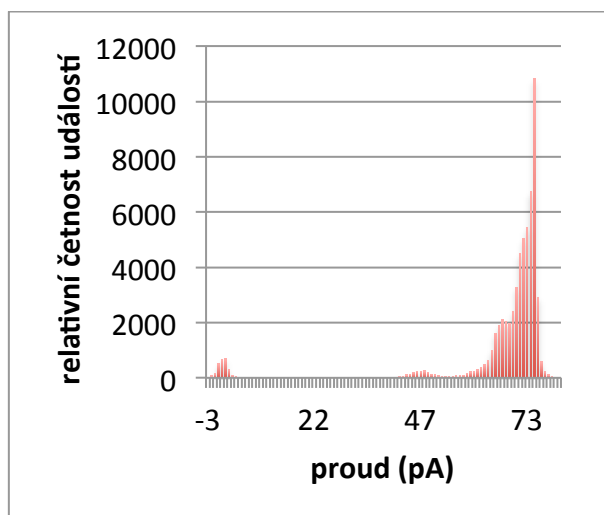
5.4.9 Blokáce fonticinových kanálů polyethylenglykolem 8000

Zkoušeli jsme také blokovat fonticinové kanály polydisperzním polyethylenglykolem 8000, to znamená že se jedná o neuniformní oligomery, jejichž průměrná molární hmotnost je 8000 M. Očekávali jsme tedy různorodé blokáce fonticinových kanálů. Polyethylenglykol byl přidáván na stranu trans teflonové kyvety v koncentraci 1,5 mg/ml. Blokáce způsobené

molekulami polyethylenglykolu jsou ukázány v následujícím obrázku (Obr. 37). Z grafu proudových událostí (Obr. 38) je patrné, že polyethylenglykol fonticinové kanály příliš neblokoval. Distribuce jednotlivých blokáci se pohybuje v blízkosti proudu, odpovídajícímu jednomu otevřenému kanálu.



Obr. 37: Blokace otevřeného fonticinového kanálu molekulami polyethylenglykolu 8000.



Obr. 38: Histogram iontových proudů fonticinového kanálu, blokováného molekulami polyethylenglykolu 8000.

Fonticiny tvoří na černých lipidických membránách pěkné, stabilní a dobře definované kanály. Tyto kanály jsou blokovatelné spektrem různých molekul, ale zatím to vypadá, že jsou blokace neuniformní i v případech, kde bychom očekávali blokace jednotné. Snad to může být způsobeno vazebnými místy pro dané analyty. Nejlepší blokace z tohoto souboru látek způsobuje BSA. Blokace jsou zřetelné a docela definované, pravděpodobně je to způsobeno tím, že je molekula BSA v 1M močovíně značně flexibilní. Pro lepší analýzu částic nanodiamantů bude nutné vyzkoušet různé povrchové náboje a lépe kontrolovat jejich agregaci (pomocí Mg^{2+} iontů). Aby bylo možné spolehlivě blokovat fonticiny také DNA, bude nutné používat kratší úseky syntetizované DNA a purifikované fonticinové částice.

6 Diskuze

Fonticiny jsou bakteriociny odvozené z fágů, které jsou schopny se vázat na povrchové struktury citlivých buněk blízce příbuzného bakteriálního kmene. Po vazbě na bakteriální vnější membránu dojde ke kontrakci fonticinové částice a k penetraci bakteriální vnější i vnitřní membrány. Tento mechanismus se v mnohém podobá sekrečnímu systému typu VI a vede k depolarizaci buněčné membrány a následné buněčné smrti. Studium fonticinů je zajímavé jak z pohledu základního výzkumu, tak z možné aplikace fonticinových nanopórů jako zařízení na charakterizaci velikosti a tvaru různých makromolekul a nanočástic.

Cílem této diplomové práce bylo ověření baktericidních účinků fonticinů na živých buňkách i na umělých membránových systémech. Baktericidní schopnost fonticinů produkovaných do supernatantu jsme testovali vytvářením inhibičních zón (Obr. 12). Při všech třech způsobech indukce docházelo k vytváření zřetelných inhibičních zón na citlivém kmeni. Jednotlivé způsoby indukce se od sebe lišily pouze čírostí vzniklých zón. Pravděpodobně díky tomu, že jsou fonticiny do média produkovány v odlišných koncentracích v závislosti na způsobu indukce. V případě nižší koncentrace fonticinů v supernatantu (při indukci mitomycinem C 4 h při 30°C a 14 h při 30°C) nejspíš docházelo k navázání veškerých fonticinů na citlivé buňky, které tím byly zabity. Zbylé buňky, bez navázaných fonticinů, přežily a přes inhibiční zónu přerostly. Tyto výsledky jsou v souladu s výsledky z růstové křivky – inhibice růstu přidavkem fonticinů (Obr. 13). Tedy konkrétně situace, kdy relativně malý přídavek fonticinů vyvolá prakticky zastavení růstu, který je však po určité době obnoven s původní dobou zdvojení.

Z výsledků na inhibičních zónách je rovněž patrné, že fonticinové částice agarem nedifundují tak, jak je tomu například u některých antibiotik. Inhibiční zóny jsou vždy jen tak velké, jak velká byla nanesená kapka fonticinového supernatantu, což znamená, že fonticiny jsou tak velké proteinové komplexy, že difundovat sítí agaru v kultivačním médiu nemohou. Citlivost bakteriálních kmenů k fonticinům je způsobena rozdílným zastoupením membránových lipopolysacharidů, proteinů a lipidů. Proto se ve své další práci pokusím porovnat genom produkčního kmene s kmeny citlivými k fonticinům. Výsledky by nám mohly objasnit, jaká membránová struktura je skutečně receptorem. Zajímavé je, že na černých lipidických membránách jsou fonticiny schopny tvořit transmembránové póry do membrány i bez přítomnosti lipopolysacharidů. Váží se ale s menší efektivitou; na membránu

se váže pouze neskutečně malý počet molekul fonticinů, který jsme přesto schopni detekovat díky citlivosti metody.

Indukce produkce fonticinů UV zářením nevedla k žádné aktivitě supernatantů na živých buňkách, ale ve vzorcích z elektronového mikroskopu byla přítomnost fonticinových částic detekována. Pravděpodobně se jednalo o tak nízkou koncentraci fonticinových částic produkovaných do média, které bylo k živým buňkám přidáváno, že na jednu bakteriální buňku připadala v průměru méně než jedna fonticinová částice. V takto nízké koncentraci se baktericidní účinek fonticinů nemohl projevit.

Schopnost fonticinů inhibovat růst citlivých bakteriálních kmenů byla testována také na rostoucích buňkách v tekutém médiu. Byla sledována růstová křivka *P. fontium* 24647, kdy k jednotlivým paralelám bylo přidáno 20 % etanolu, 1 %, 5 % a 10 % (v/v) fonticinů v supernatantu (Obr. 13). Etanol spolu s 10 % (v/v) fonticinů spolehlivě inhibovaly růst citlivého kmene. Fonticiny, přidané v koncentraci 1 % (v/v) zpomalily růst kultury na dobu, než došlo navázání veškerých částic na buňku, potom však začala kultura opět růst exponenciálně. V případě 5% přídavku fonticinů by bylo nutné měřit růst bakteriální populace delší čas, aby bylo možné zjistit, jestli se buňky také opět rozrostou. Dalším krokem by mohlo být testování vzniku rezistence, kdy bychom selektovali subpopulaci, která se v přítomnosti fonticinů lépe množí (kultura s 1% přídavkem). Pasážovaná kultura by se přeočkovala a přidaly by se k ní fonticiny. Následně bychom mohli sledovat, jestli se vyselektuje kultura bez specifických povrchových receptorů, nejspíš lipopolysacharidů.

Propidium jodid se běžně používá na detekci hynutí bakteriálních buněk (Riccardi a Nicoletti 2006). Položili jsme si ale trochu jinou otázku: dostává se propidium jodid do buněk nebo leze DNA ven z buňky? Při pokusech, kdy byl měřen růst intenzity fluorescence, který odpovídal vazbě molekul propidium jodidu na bakteriální DNA, nelze přesně určit, jestli se propidium jodid dostává do buněk fonticinovým pórem, nebo zda dochází vlivem fonticinových partikul k lýzi buněčné membrány a k uvolnění DNA do prostředí (Zhao *et al.* 2010). V obou z těchto případů je totiž nárůst fluorescence stejný a při fluorescenčním měření tyto děje nemůžeme od sebe odlišit tak, aby bylo možné posoudit, jakým způsobem dochází k hynutí buněk. Podle snímků z transmisní elektronové mikroskopie se zdá být pravděpodobné, že dochází spíše k lýzi buněk díky navázání velkého množství bakteriocinových částic na receptory citlivých buněk. Tato teorie by mohla být ověřena pomocí fluorescenční konfokální mikroskopie, kdy bychom se mohli podívat, jestli je oranžově svítící DNA uvnitř nebo vně buněk.

Data získaná fluorescenčními pokusy s propidium jodidem byla proložena Hillovou funkcí za účelem zjistit, zda je účinek fonticinů kooperativní. Hillovo číslo nemá reálný odraz v tomto modelu jako u proteinových komplexů, kritický počet fonticinů se může lišit v závislosti na buňce a na jejím fyziologickém stavu. Také třeba na objemu bakteriální buňky. Menší buňky by mohly být zabíjeny třeba jen jednou částicí a pro větší buňky bude potřeba více partikulí. Pro účinek fonticinových komplexů neplatí enzymová kinetika, mechanismus působení neznáme.

Pomocí transmisního elektronového mikroskopu jsme zjistili, že jsou fonticiny produkovány do média v naprosté většině jako kontraktilní částice ve své nativní podobě. V médiu se vyskytují téměř ze 70 %. Kontrahované kontraktilní částice jsou pak v médiu zastoupeny asi z 20 %. Zbylé částice jsou flexibilní fonticiny a artefakty, vzniklé pravděpodobně z několika podjednotek kontrahovaných pouzder. Jestli jsou za pórotvorné vlastnosti fonticinů zodpovědné pouze nekontrahované částice, nebo se na vytváření membránových pórů podílejí i ostatní částice, zatím neumíme s jistotou určit. Bude tedy nutné izolovat a purifikovat fonticinové částice v gradientu CsCl a použít jednotlivé frakce k podobnému testování. Zatím spekulujeme, že na dalších pokusech s fonticiny zabudovanými do umělých membrán se nanopórový kanál vytváří díky dosud nekontrahovaným částicím, které při vazbě na membránu změní konformaci a umožní tvorbu reálného vodivého kanálu.

Druhá část této diplomové práce byla zaměřena převážně na *in vitro* pokusy na černých lipidických membránách. Pro všechny další pokusy bylo důležité najít podmínky, ve kterých budou fonticiny vytvářet stabilní, dlouhotrvající póry do fosfolipidových membrán. Nejprve byla měřena závislost vodivosti fonticinového kanálu na koncentraci elektrolytu. Tato závislost byla měřena v 10mM, 100mM a 1M NaCl s 8mM MgCl₂ (Obr. 21). Ukázalo se, že vodivostní závislost je téměř lineární. Fonticinové kanály jsou tedy tak velké, že nedochází k omezování pohybu iontů uvnitř kanálu. Ze směrnice přímky můžeme vyvodit „specifickou vodivost“, tedy hodnotu, která určuje schopnost póru měnit vodivost se zvyšující se koncentrací elektrolytu. „Specifická vodivost“ je v tomto případě 1,4 pS*l/mM, což znamená, že na 1 mM/l NaCl se vodivost kanálu zvedne o 1,4 pS.

Distribuce velikosti kanálu ve třech různých koncentracích elektrolytu je značně rozlišná. V 1M NaCl tvoří fonticiny homogenní kanály s velmi podobnou vodivostí. Ve 100mM NaCl je distribuce vodivostí jednotlivých kanálů velmi široká. To může být způsobeno například nestabilitou fonticinových částic v elektrolytu. Pokud by se fonticiny

rozpadaly na proteinové podjednotky, tak by mohly vytvářet kanály s odlišnou vodivostí v závislosti na délce dané podjednotky. V 10mM NaCl jsou dokonce patrné dva hlavní vodivostní stavy, patrně opět způsobené nestabilitou fonticinových částic.

Vodivosti fonticinových pórů je pouze dvakrát větší než vodivost α -hemolysinového póru. Z našich výpočtů je patrné, že vnitřní průměr fonticinového kanálu je přibližně 5 nm, to znamená, že velikost průřezu fonticinového póru je 24x větší než průřez α -hemolysinového póru. Vodivost fonticinového póru je totiž značně snížena délkou fonticinové nanotrubičky, která je přibližně desetkrát delší než α -hemolysin. Jedná se vlastně o paradox, kdy nanopór s 24x větším průřezem má velmi podobnou vodivost jako kontrolní komplex a to právě díky délce.

Jako kontrolní molekula pro pokusy, kdy byl nanopór blokován různými analyty byl použit α -hemolysinový nanopór (Obr. 25). Z histogramu událostí na otevřeném kanálu α -hemolysinu se zdá, že jsou blokace polyethylenglykolem 1251,5 nehomogenní. Očekávali bychom přesněji vymezený výskyt blokáci na jedné proudové hladině, protože PEG je monodisperzní. Nestejnorodost získaných dat blokáci je zapříčiněna pravděpodobně přítomností Mg^{2+} iontů v roztoku. PEG má v těchto podmínkách pravděpodobně různou konformaci. Za jiných podmínek, kdy nebyly do roztoku přidávány ionty hořčíku, jsme nasbírali data, kdy byly blokace mnohem definovanější. Bylo by dobré otestovat polyethylenglykol pomocí reálné hmotnostní spektrometrie, abychom zjistili, zda se nerozpadá a je opravdu monodisperzní.

Při testování fonticinových kanálů jako potenciálního nanozařízení na charakterizaci vlastností různých molekul byly používány fonticiny produkované do supernatantu. Supernatant byl ihned po indukci filtrován tak, abychom se zbavili případných bakteriálních kontaminací a zajistili tím určitou stabilitu částic. Je však nutné vzít v úvahu možnost, že filtrace úplně nezbavila supernatant makromolekulárních nečistot. Spolu s nesestavenými podjednotkami proteinových komplexů fonticinů, které se během skladování do filtrovaného supernatantu bezesporu také uvolňovaly, mohly tyto kontaminace ovlivňovat stabilitu otevřených nanopórů a zvyšovat šum membrán. V dalších pokusech proto plánuji fonticiny izolovat pomocí centrifugace v gradientu CsCl. Díky tomu bychom měli být schopni oddělit fonticiny od ostatních proteinových sloučenin produkovaných do média, stejně tak jako oddělit jednotlivé typy fonticinů (kontraktilní od flexibilních). Na černých lipidických membránách by potom bylo možné zkoumat pórotvorné vlastnosti jednotlivých částic, kdy bychom mohli potvrdit, že za vznik membránových kanálů jsou opravdu zodpovědné kontraktilní fonticiny typu R.

Při pokusech na umělých membránách, musíme vzít v úvahu také to, že pokud by došlo k blokaci kanálu až na bazální úroveň proudu, nebylo by možné na černých lipidických membránách detekovat jednotlivé kanály zabudované do membrány. Na takovém záznamu by se totiž blokový kanál jevil jako intaktní membrána s nulovou vodivostí. Makromolekula (nebo částice), která do nanopóru „nejlépe pasuje“ tedy paradoxně znemožní spolehlivou detekci.

Fonticinové kanály jsou dostatečně velké na to, aby jimi mohla snadno procházet DNA. Díky negativnímu náboji na DNA prochází tyto molekuly kanálem elektroforeticky. Pro tyto účely byla použita plazmidová DNA (plazmid pDG1661) o délce 10 000 bp. Cirkulární DNA musela být nejprve linearizovaná, protože v cirkulární podobě tvoří DNA nadobrátky, které by fonticinovým pórem nemohly procházet. Zdá se, že dvouvláknová DNA, navzdory předpokladu, fonticinovým kanálem prakticky neprocházela. Mírné blokace (Obr. 28) fonticinového kanálu s přidáním dvouvláknové DNA mohou být pravděpodobně způsobeny přítomností podjednotek degradovaných fonticinových partikulí. Po neúspěchu s dvouvláknovou DNA jsme chtěli vidět blokace fonticinového kanálu jednovláknovou DNA. Před každým měřením byla linearizovaná dsDNA denaturována (90°C, 5 min). Při pokusech, kdy byly fonticinové kanály blokovány ssDNA nedocházelo ke vzniku pravidelných, snadno rozlišitelných blokáci. Navíc se blokace v čase zhoršovaly, docházelo ke snížení četnosti i hloubky jednotlivých blokáci. Pravděpodobně docházelo k tomu, že denaturovaná DNA reasociovala za vzniku nedefinovatelných agregátů poté, co byla přidána do měřicího pufru, kde došlo k okamžitému zchlazení. Pro budoucí pokusy plánuji používat na blokaci fonticinů ssDNA krátké (50 nukleotidů) syntetické úseky DNA, které by dlouhou fonticinovou nanotrubíčkou procházely snáze v porovnání s dlouhou plazmidovou DNA. Tím by se rovněž snížilo riziko reasociace jednovláknových molekul.

Dále jsem zkoumala napěťovou závislost fonticinů blokových ssDNA. Měření blokáci na fonticinových kanálech probíhalo běžně při aplikovaném potenciálu 50 mV. Předpokládali jsme, že vyšší napětí (Obr. 32, vždy levá část záznamu) způsobí častější a rychlejší průchod ssDNA nanopórem, než napětí nižší (pravá část záznamu). Na membránu jsem tedy aplikovala napěťové kmity v rozsahu 60 až 10 mV. Fonticinové kanály sice byly v těchto pokusech blokovány jednovláknovou DNA, ale ne rychleji ani častěji než při nižších potenciálech. Pravděpodobně je zapotřebí aplikovat napěťové kmity s vyšším rozsahem. V dalších pokusech plánujeme použít kmity s rozsahem 150 – 0 mV, které by měly mít na ssDNA větší vliv.

Fonticinové kanály byly rovněž blokovány částicemi nanodiamantů. Nanodiamanty způsobovaly zřetelné blokace iontového proudu o různých velikostech. Často ale také docházelo k interakci nanodiamantových částic s fosfolipidy membrány. Takové membrány pak byly nestabilní a často praskaly. Na záznamu iontového proudu se tyto interakce projevovaly také zvýšeným šumem na membráně. Samotné nanodiamantové částice mají neutrální náboj, ale bývají terminovány vodíkem nebo kyslíkem, což částicím povrchový náboj udává. Díky těmto terminacím by mohlo docházet k vazbě nanodiamantových částic do fonticinového póru. Navázané částice v póru by tak mohly bránit zřetelnému zaznamenávání blokad. Další komplikací při snaze charakterizovat nanodiamantové částice na černých lipidických membránách byla také tvorba agregátů.

Při pokusech s nanodiamanty může mít vliv na agregaci částic jejich zeta potenciál. Zeta potenciál na rozhraní pevné látky a kapaliny závisí na řadě faktorů, mezi které patří koncentrace iontů, jejich náboj, pH a teplota roztoku. Z těchto důvodů je nutné měřit nanodiamanty v co možná nejméně koncentrovaném roztoku, abychom předešli vzniku agregátů. Nanodiamantové částice byly měřeny i v 10mM NaCl, 5mM Trisu, při pH 7,3. Kvůli správné funkci fonticinů byla v roztoku nutná i přítomnost dvojmocných iontů hořčíku v podobě 8mM $MgCl_2$. Přítomnost hořečnatých iontů v roztoku tak zvýšila koncentraci elektrolytu a patrně mohla ovlivnit i hodnotu zeta potenciálu. V 10mM NaCl také dochází k tomu, že velikost fonticinových kanálů je značně nehomogenní. Pro další pokusy s nanodiamanty bude nutné analyzovat, jak se nanodiamantové částice chovají v různých koncentrovaných pufrách, abychom si mohli být jisti, že k agregaci při našich pokusech nedochází.

Na černých lipidických membránách byla testována také schopnost BSA procházet fonticinovými kanály. Předpokládali jsme, že bychom na záznamu mohli vidět schodovité blokace, odpovídající rozbalování proteinu během translokace, což bylo pro jiný protein dříve pozorováno (Rodriguez-Larrea a Bayley 2014). Při měření se ukázalo, že protein v nativní konformaci fonticinové kanály neblokuje. V dalších pokusech bylo BSA denaturováno přidávkem močoviny (o koncentraci 1M) na trans stranu k BSA v teflonové kyvetě. Denaturovaný protein nejen, že kanálem procházel, ale způsoboval také masivní blokace iontového proudu. Jediným problémem v tomto pokusu byla přítomnost močoviny v měřicí aparatuře, která značně zvyšovala viskozitu prostředí, což se negativně projevilo na schopnosti fosfolipidů tvořit stabilní membrány.

V neposlední řadě byl fonticinový nanopór blokován také polydisperzním polyethylenglykolem 8000. Polyethylenglykol byl použit jako kontrolní molekula, neboť

schopnost blokovat nanopóry různě velkými molekulami byla pospána v řadě různých prací (Robertson *et al.* 2007; Reiner *et al.* 2010). Také naše výsledky z měření blokací α -hemolysinu monodisperzním polyethylenglykolem 1251, 5 byly pozitivní. Fonticiny však blokovány nebyly. Hlavním důvodem je pravděpodobně velikost molekul polyethylenglykolu, které byly příliš malé co do průměru a krátké na délku na to, aby způsobovaly blokace tak velkého nanopóru.

Fonticinové nanočástice se dají poměrně snadno produkovat. Spolehlivě fungují na černých lipidických membránách, kde je jejich vodivost uniformní, alespoň ve vyšších koncentracích NaCl. Zjistili jsme, že fonticinovými molekulami může procházet velké množství různých analytů. Těchto vlastností se dá využít jednak k pochopení dějů, které vedou k zahubení napadené buňky, ale také k výzkumu vlastností makromolekul, které jimi necháme cíleně procházet *in vitro*.

7 Souhrn

Produkční kmen *Pragia fontium* 24613 produkuje bakteriociny podobné krčkům fágů, které mají baktericidní účinek proti některým blízce příbuzným kmenům z čeledi *Enterobacteriaceae*. Tyto bakteriociny nejsou schopny inhibovat růst vlastního produkčního kmene. Fonticiny jsou do média produkovány ve čtyřech různých konformacích: kontraktilní fonticiny v nativní podobě, kontraktilní fonticiny v kontrahované podobě, flexibilní fonticiny a fonticiny složené z pouzder kontrahovaných částic. V této práci se mi podařilo zjistit následující nové informace o fonticinech:

- Schopnost inhibovat růst bakteriální kultury je závislá na koncentraci přidaných fonticinů. Fonticiny nedifundují agarem při testování inhibičních zón.
- Na zabití jedné bakteriální buňky je patrně nutná více než jedna fonticinová částice.
- Distribuce vodivostí fonticinových kanálů je závislá na koncentraci elektrolytu téměř lineárně.
- Vnitřní efektivní průměr fonticinové nanotrubičky je: $d_{ef} \geq 4,9$ nm.
- Fonticinové kanály jsou dobře blokovatelné denaturovaným BSA.
- Fonticinové nanotrubičky jsou blokovatelné nanodiamanty, pokud netvoří příliš velké agregáty.
- Purifikované fonticinové částice bude možné použít na charakterizaci kratších úseků DNA.

8 Seznam literatury

- Adams, M. H.** (1949): THE STABILITY OF BACTERIAL VIRUSES IN SOLUTIONS OF SALTS. *The Journal of General Physiology*, 32(5), 579-594.
- Akeson, M., Branton, D., Kasianowicz, J. J., Brandin, E., Deamer, D. W.** (1999): Microsecond time-scale discrimination among polycytidylic acid, polyadenylic acid, and polyuridylic acid as homopolymers or as segments within single RNA molecules. *Biophysical Journal*, 77(6), 3227-3233.
- Aldová, E., Hausner, O., Brenner, D. J., Kocmoud, Z., Schindler, J., Potužníková, B., Petráš, P.** (1988): *Pragia fontium* gen. nov., sp. nov. of the Family Enterobacteriaceae, Isolated from Water. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 38(2), 183-189.
- Astier, Y., Braha, O., Bayley, H.** (2006): Toward single molecule DNA sequencing: direct identification of ribonucleoside and deoxyribonucleoside 5'-monophosphates by using an engineered protein nanopore equipped with a molecular adapter. *Journal of the American Chemical Society*, 128(5), 1705-1710.
- Basler, M.** (2015): Type VI secretion system: secretion by a contractile nanomachine. *Philosophical Transactions of the Royal Society B-Biological Sciences*, 370(1679).
- Basler, M., Pilhofer, M., Henderson, G. P., Jensen, G. J., Mekalanos, J. J.** (2012): Type VI secretion requires a dynamic contractile phage tail-like structure. *Nature*, 483(7388), 182-186.
- Bayley, H.** (2006): Sequencing single molecules of DNA. *Current Opinion in Chemical Biology*, 10(6), 628-637.
- Behrens, H. M., Six, A., Walker, D., Kleanthous, C.** (2017): The therapeutic potential of bacteriocins as protein antibiotics. *Emerging Topics in Life Sciences*, 1(1), 65-74.
- Berkane, E., Orlik, F., Stegmeier, J. F., Charbit, A., Winterhalter, M., Benz, R.** (2006): Interaction of bacteriophage Lambda with its cell surface receptor: An in vitro study of binding of the viral tail protein gpJ to LamB (Maltoporin). *Biochemistry*, 45(8), 2708-2720.
- Bezrukov, S. M., Vodyanoy, I., Brutyan, R. A., Kasianowicz, J. J.** (1996): Dynamics and free energy of polymers partitioning into a nanoscale pore. *Macromolecules*, 29(26), 8517-8522.
- Bhakdi, S., Trantum-Jensen, J.** (1991): Alpha-toxin of *Staphylococcus aureus*. *Microbiological Reviews*, 55(4), 733-751.
- Bingle, L. E. H., Bailey, C. M., Pallen, M. J.** (2008): Type VI secretion: a beginner's guide. *Current Opinion in Microbiology*, 11(1), 3-8.
- Bonemann, G., Pietrosiuk, A., Mogk, A.** (2010): Tubules and donuts: a type VI secretion story. *Molecular Microbiology*, 76(4), 815-821.
- Butler, T. Z., Pavlenok, M., Derrington, I. M., Niederweis, M., Gundlach, J. H.** (2008): Single-molecule DNA detection with an engineered MspA protein nanopore. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(52), 20647-20652.
- Cleveland, J., Montville, T. J., Nes, I. F., Chikindas, M. L.** (2001): Bacteriocins: safe, natural antimicrobials for food preservation. *International Journal of Food Microbiology*, 71(1), 1-20.
- Coetzee, H. L., De Klerk, H. C., Coetzee, J. N., Smit, J. A.** (1968): Bacteriophage-tail-like particles associated with intra-species killing of *Proteus vulgaris*. *Journal of General Virology*, 2(1), 29-36.

- Collier, R. J., Young, J. A. T.** (2003): Anthrax toxin. *Annual review of cell and developmental biology*, 19(1), 45-70.
- Cotter, P. D., Ross, R. P., Hill, C.** (2013): Bacteriocins--a viable alternative to antibiotics? *Nature reviews. Microbiology*, 11(2), 95.
- Coulter, W. H.** (1953): Means for counting particles suspended in a fluid. City: Google Patents.
- Damasko, C., Konietzny, A., Kaspar, H., Appel, B., Dersch, P., Strauch, E.** (2005): Studies of the efficacy of enterocolitacin, a phage-tail like bacteriocin, as antimicrobial agent against *Yersinia enterocolitica* serotype O3 in a cell culture system and in mice. *Journal of Veterinary Medicine Series B-Infectious Diseases and Veterinary Public Health*, 52(4), 171-179.
- Daw, M. A., Falkiner, F. R.** (1996): Bacteriocins: nature, function and structure. *Micron*, 27(6), 467-479.
- Deamer, D. W., Akeson, M.** (2000): Nanopores and nucleic acids: prospects for ultrarapid sequencing. *Trends in Biotechnology*, 18(4), 147-151.
- Derrington, I. M., Butler, T. Z., Collins, M. D., Manrao, E., Pavlenok, M., Niederweis, M., Gundlach, J. H.** (2010): Nanopore DNA sequencing with MspA. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(37), 16060-16065.
- Fair, R. J., Tor, Y.** (2014): Antibiotics and bacterial resistance in the 21st century. *Perspectives in medicinal chemistry*, 6, 25.
- Faller, M., Niederweis, M., Schulz, G. E.** (2004): The structure of a mycobacterial outer-membrane channel. *Science*, 303(5661), 1189-1192.
- Funakoshi, K., Suzuki, H., Takeuchi, S.** (2006): Lipid Bilayer Formation by Contacting Monolayers in a Microfluidic Device for Membrane Protein Analysis. *Analytical Chemistry*, 78(24), 8169-8174.
- Ge, P., Scholl, D., Leiman, P. G., Yu, X., Miller, J. F., Zhou, Z. H.** (2015): Atomic structures of a bactericidal contractile nanotube in its pre- and postcontraction states. *Nature structural & molecular biology*, 22(5), 377-382.
- Gebhart, D., Williams, S. R., Bishop-Lilly, K. A., Govoni, G. R., Willner, K. M., Butani, A., Sozhamannan, S., Martin, D., Fortier, L.-C., Scholl, D.** (2012): Novel high-molecular-weight, R-type bacteriocins of *Clostridium difficile*. *Journal of bacteriology*, 194(22), 6240-6247.
- Ghequire, M. G. K., De Mot, R.** (2015): The Tailocin Tale: Peeling off Phage Tails. *Trends in Microbiology*, 23(10), 587-590.
- Gill, J. J., Young, R.** (2011): Therapeutic applications of phage biology: history, practice and recommendations. *Emerging trends in antibacterial discovery: Answering the call to arms*, 367-410.
- Gouaux, J. E., Braha, O., Hobaugh, M. R., Song, L., Cheley, S., Shustak, C., Bayley, H.** (1994): Subunit stoichiometry of staphylococcal alpha-hemolysin in crystals and on membranes: a heptameric transmembrane pore. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 91(26), 12828-12831.
- Govan, J. R. W.** (1974): Studies on the Pyocins of *Pseudomonas aeruginosa*: Morphology and Mode of Action of Contractile Pyocins. *Microbiology*, 80(1), 1-15.
- Gray, M., Szabo, G., Otero, A. S., Gray, L., Hewlett, E.** (1998): Distinct mechanisms for K⁺ efflux, intoxication, and hemolysis by *Bordetella pertussis* AC toxin. *Journal of Biological Chemistry*, 273(29), 18260-18267.
- Guérout-Fleury, A.-M., Frandsen, N., Stragier, P.** (1996): Plasmids for ectopic integration in *Bacillus subtilis*. *Gene*, 180(1-2), 57-61.

- Hu, B., Margolin, W., Molineux, I. J., Liu, J.** (2015): Structural remodeling of bacteriophage T4 and host membranes during infection initiation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 112(35), E4919-E4928.
- Jack, R. W., Tagg, J. R., Ray, B.** (1995): Bacteriocins of gram-positive bacteria. *Microbiological Reviews*, 59(2), 171-200.
- Kageyama, M.** (1964): Studies of a Pyocin: I. Physical and Chemical Properties. *The Journal of Biochemistry*, 55(1), 49-53.
- Kageyama, M., Ikeda, K., Egami, F.** (1964): Studies of a Pyocin: III. Biological Properties of the Pyocin. *The Journal of Biochemistry*, 55(1), 59-64.
- Kageyama, M., Shinomiya, T., Aihara, Y., Kobayashi, M.** (1979): Characterization of a bacteriophage related to R-type pyocins. *Journal of virology*, 32(3), 951-957.
- Karginov, V. A., Nestorovich, E. M., Moayeri, M., Leppla, S. H., Bezrukov, S. M.** (2005): Blocking anthrax lethal toxin at the protective antigen channel by using structure-inspired drug design. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(42), 15075-15080.
- Kasianowicz, J. J., Bezrukov, S. M.** (1995): Protonation dynamics of the alpha-toxin ion channel from spectral analysis of pH-dependent current fluctuations. *Biophysical Journal*, 69(1), 94-105.
- Kasianowicz, J. J., Brandin, E., Branton, D., Deamer, D. W.** (1996): Characterization of individual polynucleotide molecules using a membrane channel. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 93(24), 13770-13773.
- Kasianowicz, J. J., Robertson, J. W. F., Chan, E. R., Reiner, J. E., Stanford, V. M.** (2008): Nanoscopic Porous Sensors. *Annual Review of Analytical Chemistry*, 1, 737-766.
- Kawano, R., Schibel, A. E. P., Cauley, C., White, H. S.** (2009): Controlling the Translocation of Single-Stranded DNA through α -Hemolysin Ion Channels Using Viscosity. *Langmuir*, 25(2), 1233-1237.
- Kohler, T., Donner, V., van Delden, C.** (2010): Lipopolysaccharide as Shield and Receptor for R-Pyocin-Mediated Killing in *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of bacteriology*, 192(7), 1921-1928.
- Krasilnikov, O. V.** (2002): *Sizing channels with neutral polymers*. Dordrecht: Springer.
- Krasilnikov, O. V., Yuldasheva, L. N., Nogueira, R. A., Rodrigues, C. G.** (1995): THE DIAMETER OF WATER PORES FORMED BY COLICIN IA IN PLANAR LIPID BILAYERS. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 28(6), 693-698.
- Kuroda, K., Kageyama, M.** (1981): Comparative Study on F-Type Pyocins of *Pseudomonas aeruginosa*. *The Journal of Biochemistry*, 89(6), 1721-1736.
- Leiman, P. G., Basler, M., Ramagopal, U. A., Bonanno, J. B., Sauder, J. M., Pukatzki, S., Burley, S. K., Almo, S. C., Mekalanos, J. J.** (2009): Type VI secretion apparatus and phage tail-associated protein complexes share a common evolutionary origin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(11), 4154-4159.
- Leiman, P. G., Kanamaru, S., Mesyanzhinov, V. V., Arisaka, F., Rossmann, M. G.** (2003): Structure and morphogenesis of bacteriophage T4. *Cellular and Molecular Life Sciences CMLS*, 60(11), 2356-2370.
- Matsuzaki, S., Rashed, M., Uchiyama, J., Sakurai, S., Ujihara, T., Kuroda, M., Ikeuchi, M., Tani, T., Fujieda, M., Wakiguchi, H., Imai, S.** (2005): Bacteriophage therapy: a revitalized therapy against bacterial infectious diseases. *Journal of Infection and Chemotherapy*, 11(5), 211-219.

- Meadow, P. M., Wells, P. L.** (1978): Receptor Sites for R-type Pyocins and Bacteriophage E79 in the Core Part of the Lipopolysaccharide of *Pseudomonas aeruginosa* PAC1. *Microbiology*, 108(2), 339-343.
- Michel-Briand, Y., Baysse, C.** (2002): The pyocins of *Pseudomonas aeruginosa*. *Biochimie*, 84(5-6), 499-510.
- Montal, M., Mueller, P.** (1972): Formation of Bimolecular Membranes from Lipid Monolayers and a Study of Their Electrical Properties. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 69(12), 3561-3566.
- Movileanu, L., Schmittschmitt, J. P., Martin Scholtz, J., Bayley, H.** (2005): Interactions of Peptides with a Protein Pore. *Biophysical Journal*, 89(2), 1030-1045.
- Mueller, P., Rudin, D. O., Ti Tien, H., Wescott, W. C.** (1962): Reconstitution of Cell Membrane Structure in vitro and its Transformation into an Excitable System. *Nature*, 194(4832), 979-980.
- Nakayama, K., Takashima, K., Ishihara, H., Shinomiya, T., Kageyama, M., Kanaya, S., Ohnishi, M., Murata, T., Mori, H., Hayashi, T.** (2000): The R-type pyocin of *Pseudomonas aeruginosa* is related to P2 phage, and the F-type is related to lambda phage. *Molecular Microbiology*, 38(2), 213-231.
- Nguyen, H. A., Tomita, T., Hirota, M., Kaneko, J., Hayashi, T., Kamio, Y.** (2001): DNA inversion in the tail fiber gene alters the host range specificity of carotovoricin Er, a phage-tail-like bacteriocin of phytopathogenic *Erwinia carotovora* subsp *carotovora* Er. *Journal of bacteriology*, 183(21), 6274-6281.
- Parzen, E.** (1962): On estimation of a probability density function and mode. *The annals of mathematical statistics*, 33(3), 1065-1076.
- Pastoriza-Gallego, M., Rabah, L., Gibrat, G., Thiebot, B., van der Goot, F. G., Auvray, L., Betton, J.-M., Pelta, J.** (2011): Dynamics of Unfolded Protein Transport through an Aerolysin Pore. *Journal of the American Chemical Society*, 133(9), 2923-2931.
- Pazirandeh, M., Campbell, J. R.** (1993): Protein composition of rhabidosomes isolated from *Aquaspirillum itersonii*. *Microbiology*, 139(4), 859-864.
- Pinkas, D.** (2015): Vliv lipidového složení membrány na odolnost vůči surfaktinu. *Diplomová práce. Univerzita Karlova*.
- Prehm, P., Jann, B., Jann, K., Schmidt, G., Stirm, S.** (1976): On a bacteriophage T3 and T4 receptor region within the cell wall lipopolysaccharide of *Escherichia coli* B. *Journal of Molecular Biology*, 101(2), 277-281.
- Reiner, J. E., Kasianowicz, J. J., Nablo, B. J., Robertson, J. W. F.** (2010): Theory for polymer analysis using nanopore-based single-molecule mass spectrometry. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(27), 12080-12085.
- Riccardi, C., Nicoletti, I.** (2006): Analysis of apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry. *Nat. Protocols*, 1(3), 1458-1461.
- Riede, I., Degen, M., Henning, U.** (1985): The receptor specificity of bacteriophages can be determined by a tail fiber modifying protein. *The EMBO Journal*, 4(9), 2343-2346.
- Riley, M. A.** (1998): Molecular mechanisms of bacteriocin evolution. *Annual review of genetics*, 32(1), 255-278.
- Robertson, J. W. F., Rodrigues, C. G., Stanford, V. M., Robinson, K. A., Krasilnikov, O. V., Kasianowicz, J. J.** (2007): Single-molecule mass spectrometry in solution using a solitary nanopore. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(20), 8207-8211.

- Rodriguez-Larrea, D., Bayley, H.** (2013): Multistep protein unfolding during nanopore translocation. *Nat Nano*, 8(4), 288-295.
- Rodriguez-Larrea, D., Bayley, H.** (2014): Protein co-translocational unfolding depends on the direction of pulling. *Nature communications*, 5.
- Rosenblatt, M.** (1956): REMARKS ON SOME NONPARAMETRIC ESTIMATES OF A DENSITY-FUNCTION. *Annals of Mathematical Statistics*, 27(3), 832-837.
- Russell, A. B., Peterson, S. B., Mougous, J. D.** (2014): Type VI secretion system effectors: poisons with a purpose. *Nature Reviews Microbiology*, 12(2), 137-148.
- Shikuma, N. J., Pilhofer, M., Weiss, G. L., Hadfield, M. G., Jensen, G. J., Newman, D. K.** (2014): Marine Tubeworm Metamorphosis Induced by Arrays of Bacterial Phage Tail-Like Structures. *Science*, 343(6170), 529-533.
- Snopková, K., Sedlář, K., Bosák, J., Chaloupková, E., Provazník, I., Šmajš, D.** (2015): Complete genome sequence of *Pragia fontium* 24613, an environmental bacterium from the family Enterobacteriaceae. *Genome announcements*, 3(4), e00740-00715.
- Snopková, K., Sedlář, K., Bosák, J., Chaloupková, E., Sedláček, I., Provazník, I., Šmajš, D.** (2017): Free-Living Enterobacterium *Pragia fontium* 24613: Complete Genome Sequence and Metabolic Profiling. *Evolutionary Bioinformatics Online*, 13, 1176934317700863.
- Song, L., Hobaugh, M. R., Shustak, C., Cheley, S., Bayley, H., Gouaux, J. E.** (1996): Structure of staphylococcal α -hemolysin, a heptameric transmembrane pore. *Science*, 274(5294), 1859-1865.
- Strauch, E., Kaspar, H., Schaudinn, C., Damasko, C., Konietzny, A., Dersch, P., Skurnik, M., Appel, B.** (2003): Analysis of enterocolitacin, a phage tail-like bacteriocin. In: Skurnik, M., Bengoechea, J. A., Granfors, K., (eds.): *Genus Yersinia: Entering the Functional Genomic Era*, 529. 249-251.
- Strauch, E., Kaspar, H., Schaudinn, C., Dersch, P., Madela, K., Gewinner, C., Hertwig, S., Wecke, J., Appel, B.** (2001): Characterization of Enterocolitacin, a Phage Tail-Like Bacteriocin, and Its Effect on Pathogenic *Yersinia enterocolitica* Strains. *Applied and Environmental Microbiology*, 67(12), 5634-5642.
- Summers, W. C.** (2001): Bacteriophage therapy. *Annual Reviews in Microbiology*, 55(1), 437-451.
- Šmarda, J.** (1987): Production of bacteriocin-like agents of *Budvicia aquatica* and "*Pragia fontium*". *Zentralblatt für Bakteriologie, Mikrobiologie und Hygiene. Series A: Medical Microbiology, Infectious Diseases, Virology, Parasitology*, 265(1), 74-81.
- Šmarda, J., Benada, O.** (2005): Phage Tail-Like (High-Molecular-Weight) Bacteriocins of *Budvicia aquatica* and *Pragia fontium* (Enterobacteriaceae). *Applied and Environmental Microbiology*, 71(12), 8970-8973.
- Tagg, J. R., Dajani, A. S., Wannamaker, L. W.** (1976): Bacteriocins of gram-positive bacteria. *Bacteriological Reviews*, 40(3), 722-756.
- Talaga, D. S., Li, J.** (2009): Single-molecule protein unfolding in solid state nanopores. *Journal of the American Chemical Society*, 131(26), 9287-9297.
- Taylor, N. M. I., Prokhorov, N. S., Guerrero-Ferreira, R. C., Shneider, M. M., Browning, C., Goldie, K. N., Stahlberg, H., Leiman, P. G.** (2016): Structure of the T4 baseplate and its function in triggering sheath contraction. *Nature*, 533(7603), 346-+.
- Thaler, J. O., Baghdiguian, S., Boemare, N.** (1995): PURIFICATION AND CHARACTERIZATION OF XENORHABDICIN, A PHAGE TAIL-LIKE BACTERIOCIN,

- FROM THE LYSOGENIC STRAIN F1 OF XENORHABDUS-NEMATOPHILUS. *Applied and Environmental Microbiology*, 61(5), 2049-2052.
- Tien, H. T., Dawidowicz, E. A.** (1966): Black lipid films in aqueous media: A new type of interfacial phenomenon: Experimental techniques and thickness measurements. *Journal of Colloid and Interface Science*, 22(5), 438-453.
- Torreblanca, M., Meseguer, I., Rodríguez-Valera, F.** (1989): Halocin H6, a bacteriocin from *Haloferax gibbonsii*. *Microbiology*, 135(10), 2655-2661.
- Uratani, Y., Hoshino, T.** (1984): Pyocin R1 inhibits active transport in *Pseudomonas aeruginosa* and depolarizes membrane potential. *Journal of bacteriology*, 157(2), 632-636.
- Venkatesan, B. M., Bashir, R.** (2011): Nanopore sensors for nucleic acid analysis. *Nature Nanotechnology*, 6(10), 615-624.
- Weiss, J. N.** (1997): The Hill equation revisited: uses and misuses. *Faseb Journal*, 11(11), 835-841.
- Williams, S. R., Gebhart, D., Martin, D. W., Scholl, D.** (2008): Retargeting R-type pyocins to generate novel bactericidal protein complexes. *Applied and Environmental Microbiology*, 74(12), 3868-3876.
- Winterhalter, M.** (2000): Black lipid membranes. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, 5(3-4), 250-255.
- Yamamoto, T.** (1967): Presence of rhabdosomes in various species of bacteria and their morphological characteristics. *Journal of bacteriology*, 94(5), 1746-1756.
- Yang, G., Dowling, A. J., Gerike, U., ffrench-Constant, R. H., Waterfield, N. R.** (2006): *Photorhabdus* virulence cassettes confer injectable insecticidal activity against the wax moth. *Journal of bacteriology*, 188(6), 2254-2261.
- Yu, F., Mizushima, S.** (1982): Roles of lipopolysaccharide and outer membrane protein OmpC of *Escherichia coli* K-12 in the receptor function for bacteriophage T4. *Journal of bacteriology*, 151(2), 718-722.
- Zhao, Y., Tian, Y., Cui, Y., Liu, W., Ma, W., Jiang, X.** (2010): Small Molecule-Capped Gold Nanoparticles as Potent Antibacterial Agents That Target Gram-Negative Bacteria. *Journal of the American Chemical Society*, 132(35), 12349-12356.